Essentielle Bedeutung der Eisentransportsysteme für das Wachstum von Escherichia coli in Blutserum

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
CORNELIA BRAZEL-FAISST
aus Schwäbisch Gmünd

1985

Gesamtherstellung: **aku**-Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Essentielle Bedeutung der Eisentransportsysteme für das Wachstum von Escherichia coli in Blutserum

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

CORNELIA BRAZEL-FAISST

aus Schwäbisch Gmünd

1985

Tag der mündlichen Prüfung:	18. April 1985
Dekan:	Professor Dr. H.U. Seitz
1. Berichterstatter:	Professor Dr. V. Braun
2. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. K. Hantke

Meinen Eltern

Diese Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Volkmar Braun am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II, der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Professor Dr. Braun danke ich sehr für die Überlassung des Themas, für seine stets freundliche Gesprächsbereitschaft, die weiterführenden Anregungen und die Förderung meiner Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern von Mikrobiologie I und II für alle Unterstützung und die kollegiale Begleitung - sowie insbesondere Frau Helga Wolff für die Anfertigung der Photographien.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1.	Chemikalien	15
2.2.	Nährmedien und Puffer	16
2.3.	Bakterienstämme	20
2.4.	Glaswaren- und Medienvorbehandlung	23
2.4.1.	Behandlung der Glaswaren	23
2.4.2.	Extraktion des Eisens aus Salz- und Glucoselösungen	23
2.5.	Kulturbedingungen	23
2.6.	Vorbehandlung von Serum	24
2.7.	Bindung von Eisen an Transferrin	24
2.8.	Bestimmung der Eisenkonzentration in Serum	25
2.9.	Bestimmung der Eisenbindungskapazität in Serum	26
2.10.	Wachstumsmessungen	27
2.10.1.	Wachstumstest im Biophotometer	27
2.10.2.	Lebendkeimzahlbestimmung	27
2.11.	Isolierung äußerer Membran	28
2.12.	Proteinbestimmung mit Fluram	29
2.13.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
2.14.	Eisentransportmessungen	31
2.15.	P1-Transduktion	33

Seite

2.16. Messung der ß-Galactosidase-Aktivität 34

2.17. Test auf aroB 35

3. ERGEBNISSE 36

3.1. Eisenversorgung mit Hilfe des Aerobactin-Eisenaufnahmesystems 36

3.1.1. Wachstum von Wildstämmen in Kälberserum 36

3.1.2. Wirkung des ColV-Plasmids in E.coli K-12 38

3.1.3. Beeinträchtigung des Wachstums bei verschiedenen Mutanten 38

3.1.3.1. Wachstum von Transportmutanten in Kälberserum 39

3.1.3.2. Wachstum von fhuB Mutanten in Kälberserum 39

3.1.3.3. Wachstum von Synthesemutanten in Kälberserum 42

3.1.3.4. Wachstum von fhuA Mutanten in Kälberserum 42

3.1.3.5. Wirkung verschiedener klonierter ColV-Plasmid-Bereiche auf das Wachstum in Kälberserum 42

3.1.4. Wachstum von Synthesemutanten bei Zugabe von Desferriaerobactin in Kälberserum 45

3.1.5. Auswirkung des intakten Complementsystems von Kälberserum auf das Wachstum von E.coli 45

3.1.6. Wirkung des Aerobactinsystems in Humanserum 47

3.1.7. Eisensättigung des Transferrins in Kälberserum und Humanserum 50

Seite

3.1.8. Ausprägung des Eisenmangels in Zellen, die in Serum gezüchtet wurden 50

3.2. Gewinnung von Eisen mit Hilfe des Enterochelin-Eisenaufnahmesystems 53

3.2.1. Wirkung des Enterochelinsystems auf das Wachstum in synthetischem Medium 53

3.2.2. Untersuchungen des Wachstums mit Hilfe des Enterochelinsystems in Kälberserum 55

3.2.2.1. Wachstum in Kälberserum bei Zufütterung von DHB 55

3.2.2.2. Wachstum von aroB^{+} Stämmen in Kälberserum 57

3.3. Eisenversorgung über das Eisen-Dicitrattransportsystem 57

3.3.1. Induktion des FecA-Rezeptorproteins 58

3.3.2. Transport von ^{55}Fe-Citrat 63

3.3.3. Wachstum mit Eisencitrat 65

3.3.3.1. Wachstum in synthetischem Medium 65

3.3.3.2. Wachstum in Kälberserum 68

4. DISKUSSION 69

4.1. Auswirkung des citratabhängigen Eisentransportsystems in Eisentransferrin-haltigem Minimalmedium und Kälberserum 69

4.2. Auswirkung des Enterochelin-Eisentransportsystems in Eisentransferrin-haltigem Minimalmedium und Kälberserum 72

4.3. Auswirkung des Aerobactin-Eisenaufnahmesystems in Serum 74

Seite

4.4. Vergleich der untersuchten Eisen transportsysteme in Bezug auf ihre Virulenzsteigerung 76

5. ZUSAMMENFASSSUNG 78

6. LITERATUR 79

Abkürzungen

Abb.	Abbildungen
AE	Aktivitätseinheit
Amp/Ap	Ampicillin
bidest.	bidestilliert
Ci	Curie
Cit	Citrat
cpm	"counts per minute"
DBS	Dihydroxybenzoylserin
deion.	deionisiert
DHB	2,3-Dihydroxybenzoesäure
DNase	Desoxyribonuklease
EAM	Eisenaufnahmemedium
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
Fe-Tr	Eisentransferrin
kb	Kilobasen
KS	Kälberserum
LEM	"leucocyte endogenous mediator"
Min.	Minuten
NTA	Nitrilotriacetat
OD_x	Optische Dichte bei x nm
ONPG	o-Nitrophenyl-ß-Galactopyranosid
PABS	para-Aminobenzoesäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PHBS	para-Hydroxybenzoesäure
RES	Reticuloendotheliales System
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunden
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
Tet	Tetracyclin
TG	Trockengewicht
TMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin
TY	Trypton-Yeast
ÜNK	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute

1. EINLEITUNG

Biologische Bedeutung des Eisens

Eisen ist für die meisten Organismen lebensnotwendig. Dies hat seine Ursache in der Fähigkeit des Metalls an Elektronentransportreaktionen in biologischen Systemen teilzunehmen (111). Aufgrund des nicht aufgefüllten 3d-Orbitals in der Elektronenhülle kann Eisen in zwei stabilen Valenzen auftreten: in der dreiwertigen Ferriform, sowie in der zweiwertigen Ferroform. Ihre starke Tendenz Komplexe zu bilden und das Redoxpotential machen Eisenionen zu einem unersetzbaren Bestandteil von Enzymen der Elektronentransportketten (z.B. Cytochrome, Fe-S-Enzyme) und vielen cytoplasmatischen Enzymen (z.B. Aconitase) (96).

Obwohl Eisen nach Sauerstoff, Silizium und Aluminium vierthäufigstes Element der Erdkruste ist, ist seine Anreicherung in lebenden Systemen problematisch: denn unter aeroben Bedingungen in wässriger Lösung liegt Eisen vorwiegend als schwerlösliches Hydroxid-Polymer vor. Dieser Fe^{3+}-Aquohydroxykomplex hat bei neutralem pH eine Dissoziationskonstante von ca. 10^{-38} Mol/l, so daß im Gleichgewicht die Konzentration freier Fe^{3+}-Ionen mit 10^{-12} µM extrem niedrig ist (126). Das Eisenbedürfnis der meisten lebenden Zellen ist jedoch deutlich höher, wobei für Pflanzen-, Tier- und Mikroorganismenzellen ähnliche Werte (0,3-4 µM) genannt werden (151). So benötigen z.B.

Bakterien - mit Ausnahme von Milchsäurebakterien - eine Eisenkonzentration von 0,1-1 µM, um wachsen zu können (6,16,112). Um diese Spanne von 10-11 Größenordnungen zu überwinden, waren aerob wachsende Organismen gezwungen Eisenanreicherungsmechanismen zu entwickeln. Dabei entstanden immer wieder ähnliche Lösungswege: durch Eisenkomplexbildner werden die Eisenionen in eine lösliche Form gebracht. Als solche Komplexbildner fungieren bei Säugern Proteine wie z.B. Transferrin im Serum, Lactoferrin in Sekreten und Ferritin in Zellen (109). Bei Pilzen und Bakterien sind dies sogenannte Siderophore, niedermolekulare Verbindungen wie Ferrichrom, Coprogen bzw. Enterochelin, Aerobactin, Pyochelin, Schizokinen, Meningobactin und Agrobactin; sie werden ausgeschieden, um dann als Eisenkomplexe durch hochaffine Aufnahmesysteme aktiv in die Zellen transportiert zu werden (25, 112). Diese schwere Zugänglichkeit des Eisens führt in der Natur zu einer ständigen Konkurrenz der verschiedenen Organismen um das "knappe" Metall, was letztlich zu mancher Wachstumsbegrenzung führen kann.

Bakterieninfektionen

Ein typisches Beispiel einer solchen Konkurrenzsituation ist bei Infektionen gegeben (38,137).

Die Virulenz eines Bakterienstammes ist hauptsächlich durch folgende Faktoren bestimmt: die Anheftung (Adhäsion) an Wirtszellen, das Eindringen in Gewebe oder Blut, die Resistenz gegen Serumcomplement und Phagocytose, die aktive Aufnahme von Nährstoffen und die Sekretion von Toxinen und Enzymen.

Bei der Gewinnung von Nährstoffen spielt die Fähigkeit mit Hilfe hochaffiner Transportsysteme Eisen zu erlangen eine zentrale Rolle und stellt erwiesenermaßen einen wichtigen Virulenzfaktor dar (29,130). Die Fähigkeit eines pathogenen Stammes sich in einem Wirt zu vermehren hängt von der Balance zwischen wachstumsfördernden Eigenschaften des eindringenden Mikroorganismus und den wachstumshemmenden Verteidigungsmechanismen, die der Wirt dagegen setzt, ab.

Der erste Kontakt von eindringenden Bakterien mit dem Wirt und seinen Abwehrmechanismen findet meist - wenn die Mikroorganismen nicht zum Beispiel über offene Wunden direkt in den Körper gelangen - an den Schleimhäuten statt. Neben der Auseinandersetzung mit Sekret-IgA, das gegen Anheftung von Bakterien und gegen deren Toxine wirkt, mit den Mucinen (Schleimabsonderungen), die physikalisch den Zugang zur Epithelzelloberfläche versperren, mit Lysozym, sowie mit der natürlichen Bakterienflora, geraten die Mikroorganismen bereits hier unter Eisenmangel: sie müssen mit Lactoferrin, einem eisenbindenden Protein, um das Eisen konkurrieren (104). Im Blut sorgt hauptsächlich Transferrin für eine extrem niedrige Konzentration an freien Eisenionen.
Diese eisenbindenden Proteine, Transferrin und Lactoferrin, sind für die antibakteriellen Eigenschaften von Körperflüssigkeiten notwendig. In Humanserum liegt Transferrin in einer Konzentration von ungefähr 30 µM (2,4 mg/ml) bzw. 2,1 mg/ml, Lactoferrin in einer Konzentration von nur 0,01 µM (0,8 µg/ml) vor (30,153). Umgekehrt ist in menschlicher Muttermilch bedeutend mehr Lactoferrin (2,6 mg/ml) als Transferrin (10 bis 15 µg/ml) enthalten (29).
Lactoferrin wird in sekretorischen Drüsen synthetisiert und entfaltet eine Schutzwirkung gegen die

Vermehrung von Mikroorganismen in Milch und sekretorischen Flüssigkeiten, die vor allem Schleimhäute benetzen. Auch in den sekundären Granula polymorphkerniger Leukozyten wird Lactoferrin gebildet und soll dort zu deren bakteriozider Wirkung beitragen (30).
Transferrin wird in der Leber synthetisiert und transportiert Eisen von den Schleimhautzellen des Dünndarms zu den erythropoetischen Zellen des Knochenmarks und zu den Eisenspeichern und den reticuloendothelialen Zellen in Leber und Milz (30,133).

Beide Proteine sind einsträngige Glycoproteine mit einem Molekulargewicht von ca. 75-80.000. Pro Molekül können zwei Fe^{3+}-Ionen gebunden werden. An jeder Eisenbindestelle von Transferrin sind zwei oder drei Tyrosyl-Reste und Stickstoff von einem oder zwei Histidyl-Resten beteiligt. Zusätzlich scheint je eine Anionen-Bindestelle für Bicarbonat zu bestehen, an der je ein Arginin-Rest beteiligt zu sein scheint; ohne Bicarbonat entsteht kein stabiler Eisenkomplex (5,55,141,152).
Ein funktioneller Unterschied zwischen den beiden Eisenbindestellen A und B wurde vorgeschlagen. Die A-Bindestelle soll Eisen bevorzugt an Erythrozytenvorläufer abgeben, die B-Bindestelle dagegen eher an Zellen, die an der Speicherung von Eisen beteiligt sind (5,10).
Andere entdeckten keinen Unterschied zwischen den beiden aktiven Zentren (39,79).
Beide Proteine, Lactoferrin und Transferrin, sind sich sehr ähnlich, zeigen jedoch keine immunologische Kreuzreaktion. Allerdings ist die Affinität zu Eisen(III)-Ionen von Lactoferrin 260 mal höher als die von Transferrin - besonders bei saurem pH bindet Lactoferrin deutlich besser (4,128).

Die bacteriostatische Wirkung von Transferrin im Serum besteht darin, daß es die Konzentration von freiem Eisen, das für Mikroorganismen zugänglich wäre, auf extrem niedrigen Werten hält. Die Konzentration freier Eisen(III)-Ionen im Gleichgewicht mit dem eisenbindenden Protein beträgt in menschlichem Plasma nur ca. 10^{-18} M und liegt um Größenordnungen unterhalb den Anforderungen von Bakterien (0,1-1 µM). Dies wird erreicht durch die hohe Eisenbindungsfähigkeit von Transferrin (Assoziationskonstanten von 10^{30} - 10^{36} wurden beschrieben) und durch dessen geringen Sättigungsgrad. In normalem menschlichen Blut sind nur 20-35 % der Eisenbindestellen mit Eisen besetzt (30,152). Bakterien vermehren sich also im Blut nur, wenn sie dem Transferrin mit Hilfe von Eisenkomplexbildnern Eisen entziehen können (41,99,130). Es wurde gezeigt, daß bei Zugabe von genügend Eisen um die Eisenbindeproteine zu sättigen, die Hemmwirkung wieder aufgehoben werden konnte. Dadurch konnte bewiesen werden, daß Bakterien tatsächlich durch Eisenmangel am Wachstum gehindert werden (30,88,89,134,152).

Das transferringebundene Eisen entspricht nur ungefähr 1 % des gesamten Körpereisens. Die Hauptmenge des Eisens ist gespeichert in Hämoglobin, Ferritin und Hämosiderin, neben den vielen Enzymen, die Eisen enthalten (10,18). Dieses Eisen ist für pathogene Mikroorganismen jedoch nicht zugänglich, mit Ausnahme des Hämoglobineisens, das, im Falle von Anämien oder Infektionen von Hämolysin ausscheidenden Bakterien, durch Lyse von Erythrozyten freigelassen wird (18,51).

Bei Infektionen geraten Bakterien noch stärker unter Eisenmangel, da der angegriffene Organismus den Eisengehalt von Serum und Sekreten noch weiter vermindert. Zum einen werden im Darm geringere Mengen an Eisen resorbiert, während gleichzeitig das Eisen vermehrt in Form von Ferritin gespeichert

wird. Dazu werden mehr eisenbildende Proteine, Transferrin und Lactoferrin synthetisiert. So wird Lactoferrin aus den sekundären Granula von Leukozyten, die zur Infektionsstelle wandern, freigesetzt (29,72,150,152). Eventuell soll das von Granulozyten bei Bakterienkontakt ausgeschiedene Lactoferrin an der Verschiebung von Plasmaeisen in die Speicher beteiligt sein, da es bei sinkendem pH Eisen von Transferrin abzieht, dieses aber aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit (20 Min.) schnell an das RES abgibt (133,142). Auch die Menge an Haptoglobin steigt im Serum bei Infektionen stark an. Haptoglobin bildet einen Komplex mit Hämoglobin. Es schützt so das Hämoglobineisen vor dem Zugriff von Bakterien und bewirkt eine schnelle Übergabe an das RES (40).

Als eine weitere, nichtspezifische Reaktion auf eindringende Mikroorganismen wird die Körpertemperatur erhöht, was koordiniert mit der Senkung des Serumeisenspiegels ablaufen soll. Dieses Fieber hat Auswirkung auf mehrere Komponenten von Wirtsverteidigungsmechanismen, so hemmt es zum Beispiel die Enterochelinsynthese von Bakterien. Auslösender Faktor für Reaktionen wie Temperaturerhöhung, Senkung der Serumeisenkonzentration und anderen, soll endogenes Pyrogen, LEM oder ein ähnlicher Proteinaktivator sein, der von stimulierten Monozyten oder Makrophagen ausgeschieden wird (49,85,86).

Zusätzlich erhöhen Antikörper die bakteriostatische Wirkung von Transferrin und Lactoferrin. Zum Teil soll ihre Wirkung darin bestehen, daß sie die Freisetzung bzw. die Aufnahme von Enterochelin hemmen (29,44,48,107,108).

Eisenaufnahme bei Escherichia coli

Im folgenden werden die Eisentransportmechanismen von E.coli beschrieben, da bei diesem Organismus relativ viel über Aufbau und Funktionen der Zellmembranen, sowie über Stoffwechsel und Genetik bekannt ist. Grundsätzlich sind die hier erzielten Vorstellungen über Eisenaufnahmemechanismen auf andere Bakterien übertragbar.

Neben einem unspezifischen, energieunabhängigen Eisentransportweg (46) - wahrscheinlich über passive Diffusion bei hoher Eisenkonzentration im Medium - sind gegenwärtig verschiedene Transport-

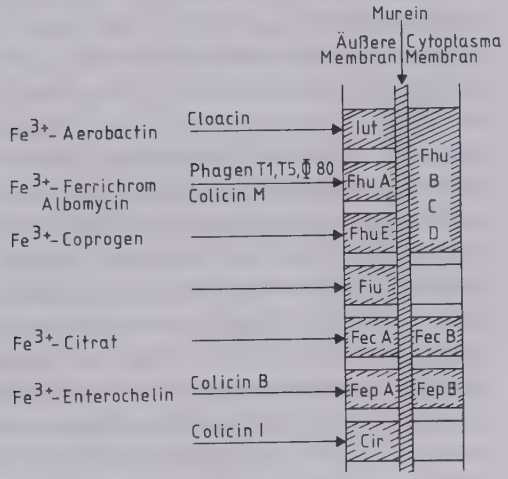

Abb. 1: Übersicht über die Eisentransportfunktionen der äußeren und inneren Membran von E.coli K-12.
Die Molekulargewichte der Rezeptorproteine betragen: Iut 74K, FhuA 78K, FhuE 76K, Fiu 83K, FecA 80,5K, FepA 81K, Cir 74K.

mechanismen bekannt, über die mittels hochaffiner Komplexbildner, bei Eisenmangelbedingungen Eisen in die Zelle geschleust wird. Die verschiedenen Siderophore werden nur bei Eisenmangel synthetisiert und für jeden Eisen-Siderophor-Komplex gibt es ein spezifisches Transportsystem.
Ein Überblick über die bisher bekannten Systeme wird in Abb. 1 dargestellt (18,113,132).

Enterochelin ist der unter den Enterobakterien am weitesten verbreitete Eisenkomplexbildner. Außer bei E.coli wurde es auch bei Salmonella typhimurium, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloace, Shigella pneumoniae und Klebsiella pneumoniae gefunden (119,132,144). Enterochelin, ein Komplexbildner vom Katecholattyp, ist ein zyklisches Trimeres aus 2,3-Dihydroxybenzoylserin und wird von der Chorisminsäure - einer Zwischenstufe der Aromatenbiosynthese - in mehreren Schritten synthetisiert und ins Medium ausgeschieden (116,121). Dazu sind mindestens 7 Gene (ent Gene) notwendig, die bei ca. 13 Min. auf der E.coli - Genkarte kartieren (103).
Der Eisen-Enterochelin-Komplex bindet an das FepA-Protein der äußeren Membran (78,81). Gleichzeitig dient FepA auch als Rezeptor für Colicin B (58,59, 62,69,124,160). Der Durchtritt durch die Cytoplasmamembran gelingt mit Hilfe des FepB Genproduktes, wahrscheinlich einer Permease in der Cytoplamamembran (120,160). Im Cytoplasma bewirkt das FesB Genprodukt die Freisetzung des Eisens. Noch ist nicht ganz geklärt, ob es sich dabei nur um eine Esteraseaktivität handelt - so daß das Chelatormolekül in 2,3-DBS- Untereinheiten gespalten wird - oder ob auch eine Reduktaseaktivität beteiligt ist, die Eisen(III) zu Eisen(II) reduziert. Die Spaltprodukte sind nicht für eine Neusynthese von Enterochelin verwendbar und werden von der Zelle ausgeschieden (34,52,77,94,116).

Ist die Biosynthese von Enterochelin z.B. durch Mutation im aroB Gen gestört, so kann dieser Block durch Zugabe von DHB umgangen werden. Diese Mutanten eignen sich daher besonders zur Untersuchung der spezifischen Eisentransportsysteme (63).

E.coli kann ohne Enterochelin auch auf Eisencitrat als einziger Eisenquelle wachsen. Das citratabhängige Eisentransportsystem wird unter Eisenmangel und nur in Gegenwart von Eisencitrat (mindestens 0,1 mM) im Medium ausgeprägt. Citrat alleine aktiviert das System nicht (36,46,80). Sowohl für den Transport als auch für die Induktion ist bzw. scheint das FecA-Rezeptorprotein in der äußeren Membran notwendig. Mindestens ein weiteres Genprodukt, das FecB-Genprodukt, ist für die Eisenaufnahme erforderlich. Dabei handelt es sich wahrscheinlich, analog zu FepB, um ein Protein - eventuell eine Permease - der Cytoplasmamembran (62,146,157,164). Nur Eisen, nicht aber Citrat, wird aktiv in die Zelle transportiert: vermutlich dissoziiert der Komplex bereits in der Membran (60).
Die Induktion des Transportsystems durch den Eisencitratkomplex ist tonB abhängig und erfolgt von außen: wahrscheinlich über Bindung an den Rezeptor der äußeren Membran, Eintritt ins Periplasma und Kontakt mit einer weiteren, hypothetischen Induktionskomponente (FecD) (163).
Ein periplasmatisches Bindeprotein ist nicht auszuschließen (145). Das citratabhängige Eisentransportsystem teilt Regulationsmechanismen mit den anderen Eisenaufnahmesystemen und braucht zusätzlich Eisendicitrat zur Induktion.
Citrat wurde als funktionelles Siderophor auch z.B.für Meningococcen, Corynebacterium diphtheriae, Microbacterium lacticum beschrieben (136).

Auch für Ferrichrom, einem Eisenkomplexbildner, der nur von Pilzen (z.B. Ustilago sphaerogena) produziert wird, besitzt E.coli - wie auch Salmonella typhimurium - ein hochspezifisches, aktives Transportsystem (68,97). Ferrichrom gehört zu den Chelatoren vom Hydroxamattyp. Es ist ein ringförmiges Hexapeptid, bestehend aus drei N-Acetyl-N-Hydroxyd-Ornithingruppen und drei Glycin-Resten (112,131).
Dem Eisenkomplex dient das FhuA-Protein als Rezeptor in der äußeren Membran. Daselbe Protein wird auch von den Phagen T1, T5, Φ 80, dem Colicin M und dem strukturanalogen Antibiotikum Albomycin als Rezeptor benutzt (23,24,27,35,70,76,148). Noch weitere Gene der fhu Region, die bei 3,5 Min. auf der E.coli Genkarte kartiert, sind für den Ferrichromtransport notwendig. Diese Gene fhuB, fhuC und fhuD (früher insgesamt fhuB) sind wohl Bestandteil aller Transportsysteme für Eisenkomplexe von Hydroxamattyp. Die FhuC- und FhuD-Genprodukte sind Proteine der Cytoplasmamembran; dem fhuB Gen konnte noch kein Genprodukt zugewiesen werden (24,43,82,122,159).
Ferrichrom transportiert Eisen nur einmal, dann wird es in einer modifizierten, transportinaktiven Form ausgeschieden: in der Membranfraktion - vermutlich in der Cytoplasmamembran - wird Eisen(III) unter Reduktion zu Eisen(II) freigesetzt und das Desferriferrichrom an einer der drei Hydroxamatgruppen acetyliert (74,95,135).

Ein weiterer Eisenchelator vom Hydroxamattyp, das Aerobactin, wird von virulenten E.coli Stämmen, die ein ColV-Plasmid tragen, produziert (15,138,147,155,156). Aerobactin besteht aus zwei N-Hydroxy-N-Acetyl-Lysin-Resten, verbunden über Citrat (50). Von drei ColV-Plasmid codierten Genen, aer BCA (iuc), ist bekannt, daß sie für die

Biosynthese von Aerobactin notwendig sind. Man nimmt an, daß durch diese Gene Enzyme der Hydroxylierung und Acetylierung der 6-Aminogruppe von Lysin, bzw. der Kopplung von N-Hydroxy-N-Acetyl-Lysin an Citrat codiert werden (57,110,117).
Die Genprodukte von zwei weiteren Genen, die in derselben Genregion des ColV-Plasmids liegen, sind am Eisenaerobactin-Transport beteiligt (11,22,93): zum einen das Iut-Protein in der äußeren Membran, es dient Ferriaerobactin und auch Cloacin, einem Bakteriocin von Enterobacter cloacae, als Rezeptor (11,53,143,144) - zum anderen ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 50.000, das in der Membranfraktion nachgewiesen wurde. Noch ist keine Funktion dieses Proteins bekannt (92). Das ganze Aerobactin-Operon des ColV-Plasmids soll von Insertionssequenzen (IS-Elementen) flankiert sein (12',100).Zusätzlich sind die chromosonalen Gene fhuB, fhuC und fhuD am Aerobactintransport beteiligt (21,22,43).
Anders als Enterochelin und Ferrichrom wird Aerobactin bei der Eisenaufnahme nicht modifiziert. Es kann mehrfach zum Eisentransport verwendet werden (19).
Das Aerobactinsystem wurde bisher außer bei E.coli bei Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, verschiedenen Salmonella-Stämmen, einem Arizona-Stamm und bei Shigella flexneri gefunden (100,118, 144,147).

Auch mit Hilfe von Coprogen und Rhodotorulasäure, weiteren Eisenkomplexbildnern von Hydroxamattyp, kann E.coli Eisen aufnehmen. Coprogen wird nur von bestimmten Pilzen, z.B. Neurospora crassa und einigen Penicillium Species produziert. Für den Transport von Eisencoprogen sind das Rezeptorprotein FhuE, sowie die Hydroxamattransportgene fhuB fhuC fhuD notwendig (66,112).

Zwei weitere Proteine der äußeren Membran, Fiu und Cir, scheinen Bestandsteile spezifischer Eisentransportsystem zu sein: zwar sind für diese Rezeptoren bis heute keine Eisenchelatoren bekannt, doch werden auch sie gemeinsam mit den bekannten Eisenkomplexrezeptoren reguliert. An das Cir-Protein bindet auch Colicin I (26,90).

Allen hier beschriebenen Eisentransportsystemen ist die Abhängikeit von tonB gemeinsam. Außerdem ist ein aktives TonB-Genprodukt für die Aufnahme von Vitamin B12, wie auch für die Sensitivität von Zellen gegen die Colicine der B-Gruppe (B,I,M,V u. a.) und die Phagen T1 und Φ 80 erfoderlich (24,47). Viele Autoren unterstützen die Hypothese, daß die TonB-Funktion für die Translokation gewisser Substanzen durch die äußere Membran benötigt wird. Sie vermuten, daß TonB Energie vom energetisierten Zustand der Cytoplamamembran auf die Rezeptoren der äußeren Membran überträgt und so deren Funktion beeinflußt (61,68,70,127,149). Als weitere Wirkungsweisen werden daneben diskutiert: Das TonB-Genprodukt soll auf die Cytoplasmamembran einwirken als positiver Regulator entsprechender Permeasegene (158,160). Es soll unstabil sein und während seiner Wirkung verbraucht werden (8,83). Wirkungsmechanismus und Standort der TonB-Funktion konnten abschließend noch nicht geklärt werden; sie spielt bei den verschiedenen tonB abhängigen Transportprozessen vielleicht auch eine unterschiedliche Rolle (26).

Zusätzlich sind die chromosomalen Gene exbB und exbC an den erwähnten Eisentransportsystemen beteiligt. Sie zeigen ähnliche Phänotypen wie tonB Mutanten. Es wurde beschrieben, daß eine Mutation im exbB Gen die Eisenaufnahme über das Ferrichrom- und Aerobactinsystem verhindert und die über das Enterochelin- und Citratsystem reduziert. Über die

Wirkungsweise ist jedoch nichts bekannt (21,22,71,123,124).

Alle Eisentransportsysteme werden erst unter Eisenmangel ausgebildet. Die schlechte Eisenversorgung führt zur Synthese von Eisenchelatoren sowie von Transportkomponenten durch Derepression der entsprechenden Gene (75,84,101,125). Die Regulation dieser Syteme konnte mit Hilfe von Genfusionen auf Transskriptionsebene untersucht werden (33): Bei Insertion des Phagen Mu dl (Ap lac), der an beliebigen Stellen der Bakterien-DNS integriert, werden die lac Strukturgene bei richtiger Orientierung der Phagen-DNS unter Kontrolle der betroffenen Gene exprimiert. Dies läßt sich durch Messung der ß-Galactosidase-Aktivität quantitativ erfassen. Bei Insertion von Mu dl in ein Gen, das durch die zelluläre Eisenkonzentration kontrolliert wird, wird die Synthese von ß-Galactosidase durch Eisen reguliert. Dabei zeigt z.B. die Transskription von fhuA geringere Variabilität zwischen guter und schlechter Eisenversorgung als die von z.B. fepA oder cir (17,18,71,161).

Die Eisenaufnahmesysteme werden koordiniert von einer Genregion, fur (ferric uptake regulation) die bei ca. 15,5 Min. auf der E.coli Genkarte kartiert. In fur Mutanten werden die betroffenen Gene mehr oder weniger konstitutiv exprimiert. Zu den fur kontrollierten Genen zählen die chromosomalen Gene fhuA, fhuBCD, fecAB, ent, fes, fepA, fhuE, fiu, tonB, cir, exbB, exbC , sowie die ColV-Plasmid codierten aerBCA (iuc) und iut Gene (18,20,64).
Das intakte fur Gen dominiert über ein mutiertes fur Gen. Dies legt die Annahme eines negativen Kontrollmechanismus nahe, bei dem fur für einen Repressor codiert, der sich bei hoher intrazellulärer Eisenkonzentration in aktivierter Form an

die Kontrollregionen der oben genannten Gene anlagert und so deren Transskription verhindert. In der fur Mutante bleibt der Repressor auch bei ausreichender Eisenversorgung inaktiv (65,67). Neben dieser gemeinsamen Regulation existieren noch zusätzliche Kontrollen der individuellen Systeme (26).

Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte festgestellt werden, welches der verschiedenen Eisenaufnahmesysteme zur Virulenz von Bakterien beiträgt, dadurch, daß es die Bakterien in die Lage versetzt,Eisen unter extremen Bedingungen, wie sie in Serum herrschen, dem Transferrin zu entreißen und als Nährstoff zu nutzen. Sowohl dem citratabhängigen als auch dem Enterochelin- und Aerobactin-Eisenaufnahmesystem wurde schon solch eine Wirkung zugeschrieben (55, 89,147,162). In synthetischem Medium und in Serum, wo Eisen in Form von teilweise gesättigtem Transferrin vorliegt, sollten diese Systeme hinsichtlich der Förderung von Bakterienwachstum verglichen werden. Dazu war es notwendig, geeignete Bedingungen zu finden, um Bakterienwachstum vor allem in Serum reproduzierbar zu messen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien waren analysenreine Reagenzien der Firma E. Merck AG, Darmstadt.

Acrylamid	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Serva, s.o.
Ampicillin	Sigma Chemie GmbH, München
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto Tryptone	Difco, s.o.
Bromphenolblau	Serva, s.o.
Chelex 100	Bio-Rad-Laboratories, Richmond, California, USA
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, s.o.
2,3-Dihydroxybenzoesäure	EGA Chemie, Steinheim
Desoxyribonuklease I	Serva, s.o.
Fluram	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Humanserum	Serva, s.o.
Humantransferrin	Behring
Kälberserum	Serva, s.o.
Lysozym	Sigma, s.o.
2-Mercaptoäthanol	Serva, s.o.
N,N -Methylenbisacrylamid	Serva, s.o.

ONPG	Serva, s.o.
Rinderserumalbumin	Sigma, s.o.
Rotiszint 11	C. Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, s.o.
Tetracyclin	Sigma, s.o.
TMED	Serva, s.o.
Tris	C. Roth, s.o.
Yeast Extract	Difco, s.o.

Die folgende Radiochemikalie stammt von Radiochemical Centre, Amersham, England:
^{55}Fe (carrier free, 373 µg/ml, 1,1 mCi/ml)

Desferriaerobactin war aus dem Bestand des Instituts.
Rinderserum wurde selbst aus Rinderblut ohne Zusatz von Citrat gewonnen.

2.2. Nährmedien und Puffer

TY-Medium:

Bacto Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g

mit deion. Wasser auf 1 l auffüllen

M9-Salze:

$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	7,5 g
KH_2PO_4	3,0 g
NaCl	0,5 g
NH_4Cl	1,0 g

mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen

M9-Medium (extrahiert):

M9-Salzlösung (5-fach konz., extrah.)	20 ml
Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin (je 1 mg/ml)	2 ml
p-Aminobenzoesäure, p-Hydroxybenzoesäure (2 mM)	2 ml
Glucose (40 %, w/w; extrahiert)	1 ml
Thiamindichlorid (1 mg/ml)	0,1 ml
$MgSO_4$-Lösung (1 M)	0,1 ml
$CaCl_2$-Lösung (0,1 M)	0,1 ml
mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen	

Zusätze zum M9-Medium (pro 100 ml Medium):

$NaHCO_3$ (76 mg/ml)	2 ml
Eisentransferrin (1/3 oder ganz mit Eisen beladen, s. 2.7)	6,1 ml
$FeCl_3$ (1 mM in 0,1 M HCl)	variabel

Eisenkomplexbildner:

Tri-Na-Citrat (0,1 M)	variabel
Dihydroxybenzoesäure (2 mM)	variabel
Desferriaerobactin	1,6 µM

Minimalmedium für den AroB-Test:

	+ Aromaten	- Aromaten
M9-Salze (10-fach konz.)	10 ml	10 ml
Trp, Tyr, Phe (je 1 mg/ml)	2 ml	-
PABS, PHBS, (2 mM)	2 ml	-
Glucose (40 %)	1 ml	1 ml
Thiamin (1 mg/ml)	0,1 ml	0,1 ml
$MgSO_4$ (1M)	0,1 ml	0,1 ml
$CaCl_2$ (0,1M)	0,1 ml	0,1 lm
Tri-Na-Citrat (0,1 M)	0,1 ml	0,1 ml
bidest. Wasser	84,6 ml	88,6 ml

Zur Herstellung der jeweiligen Nährplatten wurden jeweils 15 g/l Bacto Agar und bei Weichagar 6 g/l Bacto Agar dem entsprechenden Medium zugegeben. Für Minimalplatten wurden die einzelnen Bestandteile des Mediums, sowie der Agar getrennt autoklaviert.

EAM:

$NaH_2PO \times H_2O$	2,07 g
KH_2PO_4	0,68 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,66 g
$MgCl_2$ (1 M)	0,5 ml
$CaCl_2$ (0,1 M)	0,2 ml

mit einer Mischung aus 5N NaOH und 5N KOH (3:1) auf pH 6,9 einstellen
mit bidest Wasser auf 1 l auffüllen

Saline:

0,9 % NaCl in bidest. Wasser gelöst

Phagenadsorptionspuffer:

$MgSO_4$	100 mM
$CaCl_2$	5 mM

Acetatpuffer:

Na-Acetat	16,5 g
Essigsäure (96 %)	11,5 ml

mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen

Puffer für Messung der ß-Galactosidase-Aktivität:

$NaH_2PO_4 \times H_2O$	0,1 M
$MgSO_4$	0,001 M
ß-Mercaptoäthanol	0,05 M

gelöst in bidest. Wasser, einstellen auf pH 7,0

2.3. Bakterienstämme

Escherichia coli

Stamm	Plasmid	Genet. Eigenschaften	Herkun
AB2847	-	aroB thi tsx malT	Mikro
H1422	-	wie AB2847, jedoch rpsL cir	K. Hant
H1443	-	aroB rpsL lac araD thi	K. Hant
MC4100	-	rpsL lac araD thi	Casadab
W3110	-	K-12-Wildtyp	
BR741	-	fur-79 aroB lac rpsL malT thi cir	V. Brau
CB1422	-	wie H1422, jedoch aroB$^+$	diese Arbeit
BR10	-	wie AB2847, jedoch fepA	Mikro
WA38	-	wie AB2847, jedoch fecB	W. Wage
WA380	-	wie AB2847, jedoch fecA	W. Wage
WA1024	-	wie BR10, jedoch fecA	W. Wage
K311	pColV-K311	Wildtyp	Frederi
K311/7	-	wie K311, jedoch ohne pColV	Mikro
K311/10	pColV-K311	wie K311, jedoch aroB zhe :: Tn10	Mikro
K311/1101	pColV-K311::Mu d1	wie K311, jedoch fhuA aroB	Mikro
K311/1107	pColV-K311::Mu d1	wie K311, jedoch aroB aer (iuc)	Mikro
H647	pColV-K311	wie H1422, jedoch mit pColV	K. Hant
TK11	pColV-K311	wie AB2847, jedoch rpsL tolM und mit pColV	Mikro
BR703	pColV-K311	wie H647, jedoch fhuB	V. Brau
BR707	pColV-K311	wie H647, jedoch fhuA	V. Brau

Stamm	Plasmid	Genet. Eigenschaften	Herkunft
EN775	pColV-K311::Tn10	wie H1443, jedoch mit pColV	F. Engelbrecht
EN55	pColV-K311::Tn10	wie EN775, jedoch iut	F. Engelbrecht
EN41	pColV-K311::Tn10	wie EN775, jedoch aer (iuc)	F. Engelbrecht
WO916	pColV-K311::Tn10 (::Tn5)	wie H1443, jedoch malT lamB und aer (iuc)	Mikro II
EN777	pColV-K311::Tn10	wie W3110, jedoch mit pColV	F. Engelbrecht
KH576	pColV-K30	wie W3110, jedoch mit pColV	K. Hardy
BR691	pColV-K30	wie H1422, jedoch mit pColV	V. Braun
BR694	pColV-K30	wie BR691, jedoch iut	V. Braun
BR751	pColV-K30	wie BR741, jedoch mit pColV	V. Braun
K229	pColV-K229	Wildtyp	Fredericq
BR686	pColV-K229	wie H1422, jedoch mit pColV	V. Braun
BR688	pColV-K229	wie BR686, jedoch iut	V. Braun
CB688	pColV-K229	wie BR688, jedoch aroB$^+$	diese Arbeit
KÖ31	pColV-K229	wie BR686, jedoch fhuA	W. Köster
K328	pColV-K328	Wildtyp	Fredericq
BR689	pColV-K328	wie H1422, jedoch mit pColV	V. Braun
WO910	pColV-K328	wie BR689, jedoch aroB$^+$	Mikro II
K270	pColV-K270	Wildtyp	Fredericq
GR19	pColV-K311::Tn10 (::Tn5)	wie WO916, jedoch mit pRG12	R. Gross
GR24	pRG1	thr lac rpsL thi fhuA aroB	R. Gross

Stamm	Plasmid	Genet. Eigenschaften	Herkunft
GR35	pRG26	wie H1443, jedoch mit pRG26	R. Gross
5K31	pRG31	thr lac ser rpsL thi hsdR fhuA	R. Gross
ZI346	pColV-K30::Tn10 (::Mu dl)	wie EN775, jedoch aer (iuc)	L. Zimmermann
ZI350	pColV-K311::Tn10 (::Mu dl)	wie EN775, jedoch aer (iuc)	L. Zimmermann
ZI351	pColV-K311::Tn10 (::Mu dl)	wie EN775, jedoch iut	L. Zimmermann
H1365	-	rpsL lac araD cir::Mu dl	K. Hantke
EN775 x H1365	pColV-K311::Tn10	wie H1365, jedoch mit pColV	V. Braun
H1594	-	wie H1443, jedoch fiu::Mu dl (Ap lac)	K. Hantke
EN775 x H1594	pColV-K311::Tn10	wie H1594, jedoch mit pColV	V. Braun

Alle Stämme, außer den mit "Wildtyp" bezeichneten, sind K-12-Derivate.

2.4. Glaswaren- und Medienvorbehandlung

2.4.1. Behandlung der Glaswaren

Bei allen Versuchen unter Eisenmangelbedingungen wurden sämtliche Glasgefäße und Pipetten gründlich mit 10 mM EDTA gewaschen und anschließend fünfmal mit bidestilliertem Wasser gespült.

2.4.2. Extraktion des Eisens aus Salz- und Glucoselösungen

Um im M9-Medium definierte Eisenmangelbedingungen zu erhalten, wurden M9-Salzlösungen wie auch Glucoselösungen durch Ionenaustauschchromatographie an Chelex 100 (mit Aminodiessigsäuregruppen, die mit Schwermetallionen feste Komplexe eingehen) von Eisen gereinigt: M9-Salze wurden zehnfach konzentriert über eine Chelex 100 - Säule gegeben, mit dem doppelten Volumen von bidestilliertem Wasser eluiert und fünffach konzentriert autoklaviert. Die weitere Verdünnung erfolgte stets mit bidest. Wasser. 40 %-ige Glucoselösungen wurden ebenfalls mit Chelex 100 extrahiert und in gleicher Konzentration autoklaviert.
Alle Lösungen wurden mit bidest. Wasser angesetzt.

2.5. Kulturbedingungen

Ausgehend von Einzelkolonien auf TY-Platten wurden die Zellen - meist in TY-Medium - über Nacht unter aeroben Bedingungen im Wasserbadschüttler vorgezüchtet. Mit dieser Stationärkultur wurde das entsprechende Medium auf eine OD_{578} von 0,05 (bzw. 0,02) angeimpft. Abhängig von den Versuchsanforderungen wurden die Zellen in unterschiedlichen

Wachstumsphasen geerntet: Für Transportmessungen wurden stationäre Kulturen (OD_{578} von ca. 2,0) in verschiedenen Medien bis zu exponentiellem Wachstum weiter gezüchtet. Zur Isolierung von äußerer Membran wurden Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{578} 0,5) benötigt. Für Wachstumstests (Lebendkeimzahlbestimmung) wurden Zellen, die bis zur log-Phase gewachsen waren, mit M9-Salzen verdünnt und die Hauptkulturen mit 10^3 Zellen/ml angeimpft.

Eine OD_{578} von 1,0 entspricht einer Zelldichte von 10^9 Zellen/ml oder einer Bakterienmasse von 0,38 mg Zelltrockengewicht/ml.

2.6. Vorbehandlung von Serum

Das gefroren gelieferte Serum wurde aufgetaut, steril in gebrauchsfertige Portionen verteilt und wieder bei -18°C eingefroren.
Zur Inaktivierung des Complement-Systems wurden die aufgetauten Proben 30 Min. bei 56° C inkubiert und dann bis zum Versuchsbeginn auf Eis gestellt.

2.7. Bindung von Eisen an Transferrin

Die Beladung von Transferrin mit Eisen wurde nach einer modifizierten Methode nach Bates et al. (9) durchgeführt.

Um Transferrin zu einem Drittel mit Eisen zu beladen wurden 1 mM frisch angesetzte Transferrinlösung (mit HCl vorsichtig auf pH 3,5 eingestellt)

und 2 mM $Fe(NO_3)_3$-Lösung (ebenfalls frisch) im Verhältnis 3:1 gut gemischt. Diese Mischung blieb 1 Std. bei Raumtemperatur stehen. Danach wurde langsam mit einer fünffach konzentrierten M9-Salzlösung (pH 8,5) der pH auf 7,0 eingestellt und Bicarbonat in einer Endkonzentration von 18 mM zugegeben, was für die Bindung von Eisen an Transferrin notwendig ist.
Um alle Eisenbindestellen des Transferrins mit Eisen zu besetzen, wurde statt 2 mM $Fe(NO_3)_3$ eine 6 mM Lösung benutzt.
Die Eisentransferrinlösung wurde mit Millipore-Filtern steril filtriert und bis zu 2 Wochen bei 4° C aufbewahrt.

Für 100 ml M9-Medium (Endkonzentrationen s. 2.1.) wurden 6,1 ml Eisentransferrinlösung (mit 3 µmol Transferrin) benötigt, um eine Transferrinkonzentration von 30 µM zu erhalten, wie sie in Humanserum vorliegt.

2.8. Bestimmung der Eisenkonzentration in Serum

Als Grundlage dieser Bestimmung dienten Angaben in Merck, Organische Reagenzien für die Spurenanalyse (45).
Zu 1 ml Probe (Serum, $Fe(NO_3)_3$-Lsg.) wurden 0,1 ml 10 %ige Ascorbinsäure, 0,25 ml Acetatpuffer, 0,1 ml Bathophenanthrolinsulfonsäure-(3,8)Dinatriumsalz (1 mg/ml) und 50 µl bidest. Wasser pipettiert und dabei gut gemischt.
Nach 15 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 546 nm gemessen. Als Leerwert diente die Reagenzblindprobe (1 ml H_2O anstelle der Probe) bzw. die entsprechende Serumblindprobe (0,1 ml H_2O anstelle der Bathophenanthrolinsulfonsäurelösung).

Eine Eichkurve mit 1 - 100 µmol $Fe(NO_3)_3$/l wurde stets mitbestimmt.

2.9. Bestimmung der Eisenbindungskapazität in Serum

Der Test wurde mit Merckotest-Fertigpräparaten durchgeführt, wobei die vom Hersteller angegebenen Vorschriften beachtet wurden.

Um die Serumproteine mit Eisen zu sättigen, wurden zu 1 ml Serum 0,5 ml Tris(hydroxymethyl)aminomethan (1 mol/l, pH 8,3) und 0,2 ml Eisenstandardlösung (448 µmol/l) pipettiert und 10 Min. bei 45° C im Wasserbad inkubiert.

Damit das überschüssige, nicht gebundene Eisen reduziert und in eine rotgefärbte Verbindung übergeführt wird, wurde 0,2 ml Reduktionslösung (bestehend aus 30 mmol/l Methylaminophenolsulfat und 162 mmol/l Na-hydrogensulfit) und 0,2 ml Bathophenathrolinsulfonsäure-Dinatriumsalz (1,7 mmol/l) zugegeben und 90 Min. bei 45° C im Wasserbad inkubiert.
Die Extinktion wurde bei 546 nm gemessen gegen die entsprechende Serumblindprobe (Zugabe von 0,2 ml H_2O anstelle des Farbreagenzes).
Die freie und totale Eisenbindungskapazität wurde nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$EBK_{frei} = (0{,}838 - E_{546}) \times 596 \quad \mu g/dl$$

$$= (0{,}838 - E_{546}) \times 107 \quad \mu mol/l$$

$$EBK_{total} = EBK_{frei} + \text{Eisenkonz. des Serums}$$

2.10. Wachstumsmessungen

2.10.1. Wachstumstest im Biophotometer

Zellen, die in 20 ml TY-Medium vorgezüchtet worden waren (s. 2.5), wurden viermal mit extrahierten M9-Salzen gewaschen. Mit den gewaschenen Zellen wurden je 6,5 ml Testmedium in den EDTA-gespülten Glasküvetten des Biophotometers (ISA Jobin Yvon, Bonet-Maury) auf eine OD_{578} von 0,5 (bzw. 0,02) angeimpft.

Mit dem geräteeigenen Photometer wurde die Zelldichte der 6 Proben gemessen und mit dem Schreiber aufgezeichnet.

2.10.2. Lebendkeimzahlbestimmung

Die Bakterien wurden in 5 ml TY-Medium über Nacht bei 37° C (Stämme mit Insertion von Mu d1 bei 30° C) angezogen. In gleichem Medium wurden sie auf eine OD_{578} von 0,05 verdünnt und bis zur optischen Dichte von 0,5 gezüchtet.
Um Eisenspuren zu entfernen, wurden die Zellen dann viermal mit je 5 ml extrahierten M9-Salzen gewaschen, darin resuspendiert und auf 10^{-4} verdünnt.
2 ml Medium wurden mit 2×10^3 Zellen angeimpft und die Kulturen ca. 25 Std. (z.T. 40 Std.) lang bei 37° C (bzw. 30° C) geschüttelt.
Als Medium diente zum einen extrahiertes M9-Medium mit oder ohne Eisentransferrin, sowie verschiedenen Eisenkomplexbildnern, zum anderen Human-

bzw. Kälberserum mit den Aminosäuren TTP (10 µg/ml) und PABS, PHBS (20 µM).
Dem Serum wurden grundsätzlich diese aromatischen Aminosäuren zugesetzt, da sich herausgestellt hatte, daß die im Serum vorhandenen aromatischen Aminosäuren für aroB⁻ Stämme nicht ausreichten.

Während der Inkubation der Kulturen, wurden zu bestimmten Zeiten Proben entnommen, auf Mikrotiterplatten (Fa. Falcon) mit extrahierten M9-Salzen verdünnt und auf dem AM 69 Microshaker, Dynatech, durchmischt. Entsprechende Verdünnungen wurden auf TY-Platten ausplattiert (je 100 µl), 1-2 Tage bei 37° C (bzw. 30° C) inkubiert und die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

Bei allen Wachstumskurven wurden stets zwei Parallelkulturen gezüchtet, von denen je zwei Proben getrennt verdünnt und ausplattiert wurden.

2.11. Isolierung äußerer Membran (64)

Die Zellen wurden in 100 ml M9-Medium bzw. Serum bis zu einer OD_{578} von 0,5 gezüchtet und anschließend 15 Min. mit 5.000 Upm bei 4° C abzentrifugiert.
In Serum gezüchtete Zellen wurden, um aus dem Serum stammende Proteine von der Zelloberfläche loszulösen, in 0,1 % SDS-haltiger Saline aufgenommen, gut geschüttelt und viermal mit Saline gewaschen. Dagegen erwies sich das Waschen nur mit Saline und 0,2 M Tris/HCl als weniger wirksam.

Das Zellsediment wurde auf Eis gestellt und in 0,5 ml 0,2 M Tris/HCl (pH 8,0) aufgenommen. Folgende

Lösungen wurden nacheinander zugegeben, wobei jedesmal gemischt wurde:

1 ml	0,2 M Tris/HCl mit 1 M Sucrose (pH 8,0)
0,1 ml	10 mM EDTA (pH 8,0)
0,1 ml	Lysozym (2 mg/ml, frisch angesetzt)
3,2 ml	H_2O bidest.

Die Zellsuspension blieb ca. 10 Min. bei Raumtemperatur stehen. Unter dem Mikroskop wurde überprüft, ob sich Sphäroblasten gebildet hatten. Dann wurden 5 ml Extraktionspuffer, der aus 2 % Triton X-100, 50 mM Tris/HCl und 10 mM $MgCl_2$ (pH 8,0) bestand, dazu pipettiert.
0,1 ml DNase (1 mg/ml, frisch angesetzt) kamen hinzu und die Lösung wurde geschüttelt, bis sie nicht mehr viskos war.

Die Membranen wurden dann in 60 Min. mit 18.000 Upm abzentrifugiert.
Um Tritonreste zu beseitigen, wurden sie in Eppendorfgefäßen noch dreimal mit bidest. Wasser gewaschen und darin resuspendiert.

2.12. Proteinbestimmung mit Fluram (139)

10 µl der Membransuspension wurden auf 1,5 ml mit Na-phosphatpuffer (0,05 M, pH 8) aufgefüllt und unter kräftigem Schütteln auf dem Vortexmixer (Vortex-Genie, Bender und Holbein) mit 0,5 ml einer Fluramlösung gemischt. Die Fluramlösung enthielt 3 mg Fluram / 10 ml getrocknetes Dioxan und wurde jeweils frisch angesetzt. Die Fluoreszenz wurde in einem Eppendorf-Photometer 1101M mit

Fluoreszenz-Zusatz 1030 gemessen. Für die geforderte Anregungswellenlänge von 390 nm wurde das Filter 401 - 436 nm, für die emittierte Strahlung von 475 - 490 nm das Filter 470 - 3000 nm eingesetzt.
Eine Eichkurve mit 10 - 80 µg/ml Rinderserumalbumin wurde jeweils mitbestimmt.

2.13. SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese

Es wurde nach dem Gelsystem von Lugtenberg (98) Slab-Gele von 0,75mm Dicke und 12 cm Länge angefertigt.

Das Trenngel enthielt 11% Acrylamid und 0,075 % Methylenbisacrylamid (Verhältnis 44 : 0,3), 0,2 % SDS und 0,02 % Ammoniumpersulfat in 0,375 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,8. Nach längerer Entlüftung wurde die Polymerisation durch Zugabe von 0,2 % TMED gestartet, die Lösung zwischen die Glasplatten der Gelapparatur (SE 500 Hoefer Scientific Instruments) gegossen und mit Isobutanol überschichtet.
Das Konzentrierungsgel enthielt 3 % Acrylamid, 0,08 % Methylenbisacrylamid, 0,1 % SDS und 0,02 % Ammoniumpersulfat im 0,125 M Tris/HCl-Puffer, pH 6,8. Die Entlüftung und Polymerisation (mit 0,02 % TMED) erfolgte wie beim Trenngel.
Die Proteinproben (0,5 - 4 mg/ml) wurden in einem Auftragspuffer, bestehend aus 2 % SDS, 10 % Glycerol, 5 % 2-Mercaptoäthanol und 0,001 % Bromphenolblau in 0,625 Tris/HCl-Puffer, pH 6,8, 5 Min. lang gekocht (95° C Heizblock). Nach dem Abkühlen wurden bis zu 20 µl in die Taschen des Konzentrierungsgels aufgetragen.

Der Elektrophoreselauf wurde mit einem Laufpuffer aus 0,192 M Glycerin und 0,1 % SDS in 0,025 M Tris/HCl-Puffer, pH 8, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Stromstärke betrug im Konzentrierungsgel 9,5 - 10 mA, bis die Bromphenolblau-Bande dieses durchlaufen hatte, im Trenngel dann 12,5 mA.

Die Proteine wurden 2 Std. mit 0,25 % Coomassie Brilliant Blau, in 50% Methanol und 10 % Essigsäure, gefärbt. Anschließend wurden die Gele mit einer 7,5 % Essigsäure- und 5 % Methanol-haltigen Lösung, die mehrmals erneuert wurde, entfärbt.

Als Eichproteine dienten : Humantransferrin (78 000 Dalton), Rinderserumalbumin (67 000 Dalt.), Ovalbumin (44 000 Dalton), Chymotrypsinogen (25 000 Dalton), Myoglobin (17 800 Dalton) und Cytochrom C (12 400 Dalton).

2.14. Eisentransportmessungen

Die Bakterien wurden in M9-Medium bzw. TY-Medium bis zur stationären Phase gezüchtet (s.2.5). (In TY-Medium gewachsene Zellen wurden dann 4x in steriler Saline gewaschen).
Mit dieser Kultur wurden zu untersuchende Medien (M9-Medium mit bzw. ohne Eisentransferin oder Citrat, Kälber- und Rinderserum) auf OD_{578} 0,05 angeimpft und die Zellen bis zu einer optischen Dichte von 0,5 gezüchtet.
Die Bakterien wurden abzentrifugiert (Sorvall, 10 Min. bei 6 000 Upm), zweimal mit EAM bei 4°C gewaschen und zu einer OD_{578} von 0,5 im gleichen Medium (EAM) resuspendiert. Bis zur Durchführung des Transportexperiments wurden sie auf Eis gestellt.

Zur Unterdrückung des niedrigaffinen Eisenaufnahmesystems wurden 100 µM NTA zugesetzt. Fünf Minuten vor Beginn des Experiments wurde 0,1 % Glucose als C-Quelle zugegeben und die Transportansätze bei 37 % C und 180 Upm im Wasserbad geschüttelt.

Der zu testende Komplexbildner Citrat wurde ca. 30 Min. mit der verdünnten, radioaktiven ^{55}Fe-Lösung inkubiert (1mM ^{55}Fe und 1M Citrat im Verhältnis 1:1), bevor der Transport durch Zugabe von 10 µl ^{55}Fe-Citratlösung (mit 5 nmol ^{55}Fe = 0,825 µCi und 5 µmol Citrat) zu den 10 ml-Transportansätzen gestartet wurde.

Zu bestimmten Zeiten wurden jeweils 0,5 ml Probe entnommen und über Zellulosenitrat-Membranfilter (Typ BA 85; 0,45µm; Schleicher & Schüll, Dassel) in einer Absaugvorrichtung (Hölzel - Technik, Dorfen, Obb.) abgesaugt. Die Zellen auf den Filtern wurden zweimal mit 4 ml 0,1M LiCl gewaschen.

Nach Zugabe der Szintillator-Flüssigkeit (Rotiszint 11) zu den getrockneten Filtern konnte die Substrataufnahme durch Radioaktivitätsmessung im Szintillationszähler bestimmt werden.

Unter Verwendung der optischen Dichte der Zellsuspensionen wurden die cpm-Werte in pmol/mg Trockengewicht ausgedrückt (1.000 cpm = 57,7 pmol ^{55}Fe/mg TG).

2.15. P1 - Transduktion

Herstellung eines P1 - Plattenlysates

0,1 ml P1-Phagenlysat und 0,1 ml einer Übernachtkultur des Donorstammes wurden mit 3 ml TY-Top-Agar vermischt. Damit wurde eine TY-Platte überschichtet. Nach ca. 9 Std. Inkubation bei 27° C wurde die Weichagarschicht mit einem sterilen Spatel abgekratzt und zu 1 ml TY-Medium in einem sterilen Reagenzgläschen gegeben. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurde auf dem Vortex-Mixer kräftig durchmischt und der Ansatz 15 Min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde 15 Min. bei 4500 Upm in der Christ-Zentrifuge zentrifugiert und man erhielt das Phagenlysat als klaren Überstand. Er wurde im einem sterilen Röhrchen mit einem Tropfen Chloroform bei 4°C aufbewahrt.

P1 - Transduktion

2 ml einer ÜNK des Rezipientenstammes wurden 15 Min. bei 4500 Upm in der Christ-Zentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1,5 ml Phagenadsorptionspuffer resuspendiert und 15 Min. bei 27°C geschüttelt. Zu 0,1 ml Zellsuspension wurden 0,1 ml verschiedener Verdünnungen des Phagenlysats (unverdünnt, auf 10^{-1} und 10^{-2} verdünnt) gegeben. Zur Adsorption der Phagen wurden die Röhrchen 30 Min. bei 27°C inkubiert. Anschließend wurde jeder Probe 0,2ml 1M Natriumcitratlösung zugesetzt. Die einzelnen Ansätze wurden auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen. Zur Kontrolle wurden

die Rezipientenzellen und das Phagenlysat getränkt auf den Selektionsplatten ausplattiert.
Bei der Übertragung des aroB Gens diente E.coli K-12 W3110 als Donorstamm. Dieses Gen wurde mit Hilfe der P1-Phagen in E.coli K-12 H1422 und BR688 überführt.
Die Transduktanten wurden auf aroB Testplatten selektiert.

2.16 Messung der ß-Galactosidase-Aktivität (105)

10 ml Medium wurden mit einer ÜNK des Teststammes auf OD_{578} 0,1 angeimpft und im Wasserbadschüttler inkubiert. Bei bestimmter optischer Dichte der Kultur - meist OD_{578} 0,5 - wurden je zwei Proben von 0,2 (bzw. 0,5) ml entnommen und in Eppendorfgefäßen 3 Min. lang in der Eppendorf-Minifuge abzentrifugiert. Die Sedimente wurden bis zur Aktivitätsbestimmung der ß-Galactosidase eingefroren. Für den Enzymtest wurde jedes Sediment in 1 ml Puffer (s.2.2) resuspendiert und in Reagenzgläser überführt. Zu jedem Gläschen wurden 1 Tropfen 0,1 % SDS-Lösung und 2 Tropfen Chloroform gegeben. Die Testansätze wurden 10 Sek. auf dem Vortex-Mixer gemischt und für 5 Min. in ein 28°C-Wasserbad gestellt.

Prinzip der Aktivitätsmessung:

$$\text{ONPG} \xrightarrow{\text{ß-Galactosidase}} \text{o-Nitrophenol} + \text{Galactose}$$

Die Menge gelben o-Nitrophenols, die gebildet wird, ist ein Maß für die ß-Galactosidase-Aktivität.
Die Enzymreaktion wurde gestartet, indem zu jedem

Gläschen 0,2 ml ONPG (4 mg/ml H_2O) zugegeben wurden und die Ansätze auf dem Vortex-Mixer durchmischt wurden. Wenn die Proben genügend gelb erschienen bzw. nach max. 10 Min., wurde die Reaktion durch Zugabe von je 0,5 ml 1M Na_2CO_3 gestoppt und die Reaktionszeit notiert.
Von jeder Probe wurde nun die optische Dichte bei 546 nm und 405 nm im Eppendorf-Photometer gegen die Blindprobe bestimmt.

Die Blindprobe setzte sich zusammen aus:
1 ml Puffer, 1 Tropfen 0,1 % SDS, 2 Tropfen Chloroform, 0,2 ml ONPG und schließlich 0,5 ml Na_2CO_3.
Die OD_{405} sollte kleiner sein als 0,9. Andernfalls wurden die Proben mit dem Blindprobenansatz verdünnt.

Die Aktivität der ß-Galactosidase wurde nach folgender Formel errechnet:

$$1\ AE = \frac{OD_{405} - 1{,}59 \times OD_{546}}{t \times V \times OD_{578} \times 0{,}0045} \left[\frac{nmol\ \ ONPG}{10^9 Z. \times Min} \right]$$

dabei entspricht t der Dauer der Enzymreaktion in Minuten, V dem Volumen der eingesetzten Kulturmenge in ml.

2.17. AroB - Test

Um Stämme auf aroB Mutation zu testen, wurden diese auf M9-Agarplatten mit und ohne Zusatz aromatischer Aminosäuren ausgestrichen (s.2.2.). Und zwar wurden 0,1 ml Zellsuspension - nach Waschen und Resuspendieren in steriler Saline - auf je eine Platte der beiden Arten ausplattiert und 48 Std. bei 37°C inkubiert. AroB Mutanten können nur auf den Platten mit Aromaten wachsen.

3. Ergebnisse

3.1. Eisenversorgung mit Hilfe des Aerobactin-Eisenaufnahmesystems

Der Besitz eines ColV-Plasmids soll zur Virulenz von E.coli- Stämmen beitragen (2,37,147,155). Dies wird zurückgeführt auf die bessere Eisenversorgung durch das Aerobactintransportsystem, welches auf dem ColV-Plasmid codiert ist.
In dieser Arbeit sollte nun überprüft werden, ob E.coli-Zellen, die dieses Aerobactinsystem besitzen, transferringebundenes Eisen so nützen können, daß ein besseres Wachstum in Serum möglich ist.

3.1.1. Wachstum von Wildstämmen in Kälberserum

Zunächst wurden verschiedene ColV-Plasmid tragende Wildstämme aus dem Stuhl von kranken wie auch gesunden Menschen mit solchen Wildstämmen verglichen, die das Plasmid verloren hatten:
Dabei wuchsen die verschiedenen Wildisolate K311, K229, K270 und K328 innerhalb von 25 Std. in Kälberserum von 10^3 auf 10^6 - 10^7 Zellen/ml, dagegen erreichte der plasmidlose Stamm K311/7 nicht mehr als 5×10^3 Zellen/ml (Abb. 2).

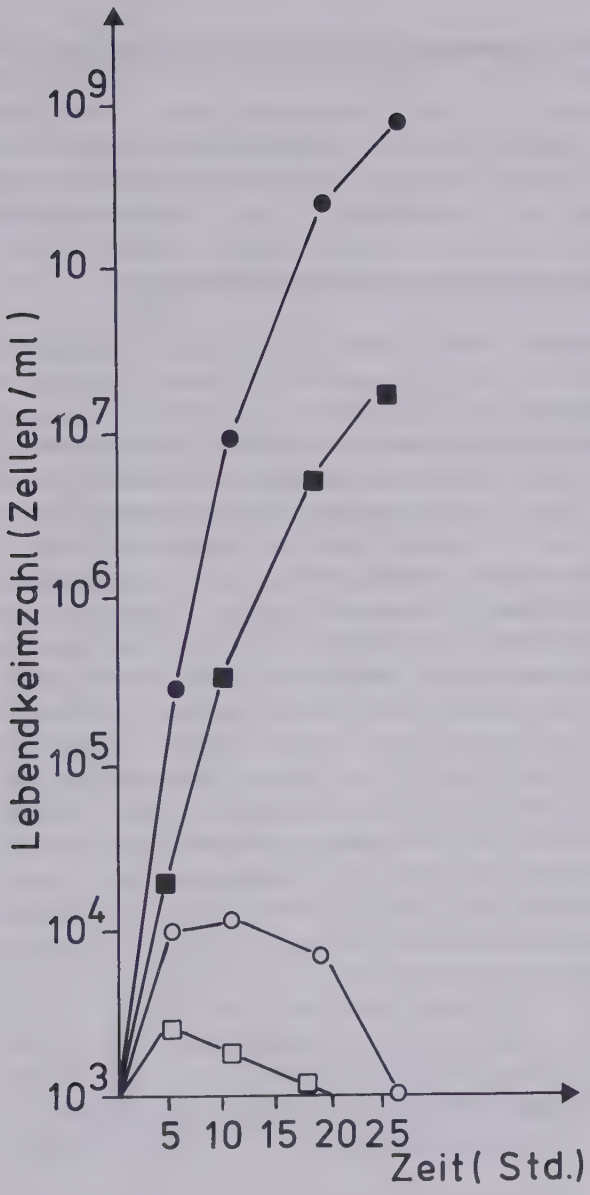

Abb. 2: Wachstum von E.coli K311 (■), K311/7 (□), K-12 H647 (●) und K-12 H1422 (○) in Kälberserum.

3.1.2. Wirkung des ColV-Plasmids in E.coli K-12

Die weiteren Versuche wurden mit K-12-Stämmen, denen aus Wildstämmen ein ColV-Plasmid übertragen worden war, durchgeführt. Der Stammhintergrund dieser Stämme war besser bekannt und die Ergebnisse daher auch besser vergleichbar.

Die Stämme waren, wenn nicht anders angegeben, aroB, um das Enterochelin-Eisenaufnahmesystem auszuschalten.
Diese pColV-haltigen K-12-Stämme erreichten eine noch höhere Zelldichte (bis zu 10^9 Zellen/ml in 25 Std.) als die entsprechenden Wildstämme. Die gleichen K-12-Stämme ohne ColV-Plasmid konnten in Kälberserum nicht wachsen (Abb. 2). Diese in Abb.2 dargestellten Ergebnisse konnten ebenfalls mit verschiedenen K-12-Stämmen, denen das gleiche ColV-Plasmid (z.B. pColV-K311: EN775, EN777, TK11) übertragen worden war, erlangt werden; sie wurden auch mit verschiedenen ColV-Plasmiden (pColV-K30 -K229, -K311, -K328) im gleichen Stammhintergrund erzielt: Die getesteten Stämme (z.B. H647, BR686, BR 689, BR 691, TK11, EN775, EN777) wuchsen alle in 25 Std. auf über 10^8 Zellen/ml. Aus diesen Ergebnissen war klar zu ersehen, daß der Besitz des ColV-Plasmids den Zellen zu besserem Wachstum in Serum verhilft.

3.1.3. Beeinträchtigung des Wachstums bei verschiedenen Mutanten

Der wachstumsstimulierende Effekt des ColV-Plasmids könnte auch von anderen Faktoren kommen,

die neben dem Eisen(III)-Aerobactinsystem noch auf dem ColV- Plasmid lokalisiert sind. Um dies auszuschliessen, wurden verschiedene Mutanten getestet, deren Aerobactinaufnahmesystem beeinträchtigt ist.

3.1.3.1. Wachstum von Transportmutanten in Kälberserum

Den cloacinresistenten Mutanten fehlt das Rezeptorprotein Iut für Cloacin und Eisen(III)-Aerobactin in der äußeren Membran. Deshalb kann Aerobactin nicht mehr in die Zelle transportiert werden.

Alle diese Mutanten (EN55, BR688, BR694, ZI351) wuchsen in 10 Std bis zu einer Zelldichte von höchstens 3 x 10^4 Zellen/ml (meist sogar kaum 1 x 10^4 Zellen/ml), danach nahm die Zellzahl wieder ab (Abb. 3).

3.1.3.2. Wachstum von fhuB Mutanten in Kälberserum

Auch bei Mutationen im chromosomalen fhu CDB Bereich wird der Aerobactintransport beeinträchtigt. Entsprechend wuchsen fhuB Mutanten (BR703) nur bis zu einer Zelldichte von ca. 2 x 10^4 Zellen/ml, die nach 10 Std. ebenfalls wieder abnahm (Abb. 3).

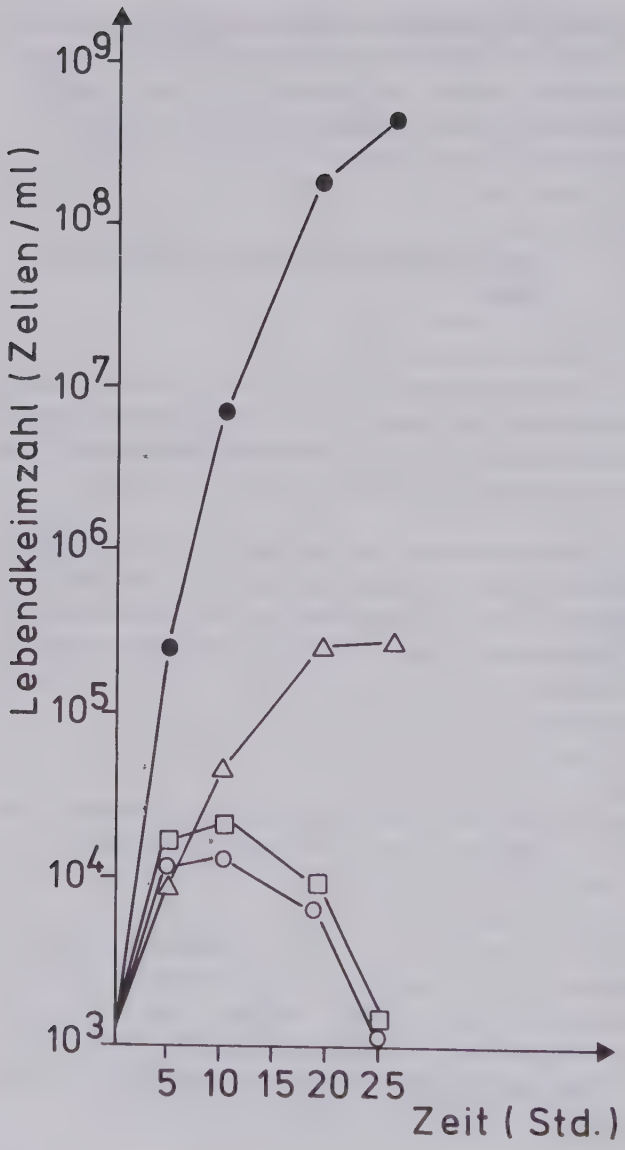

Abb. 3: Wachstum von E.coli K-12 Stämmen mit beeinträchtigtem Aerobactintransportsystem in Kälberserum: BR688 iut (○), BR703 fhuB (□), WO916 aer (△) und zum Vergleich BR686 (●).

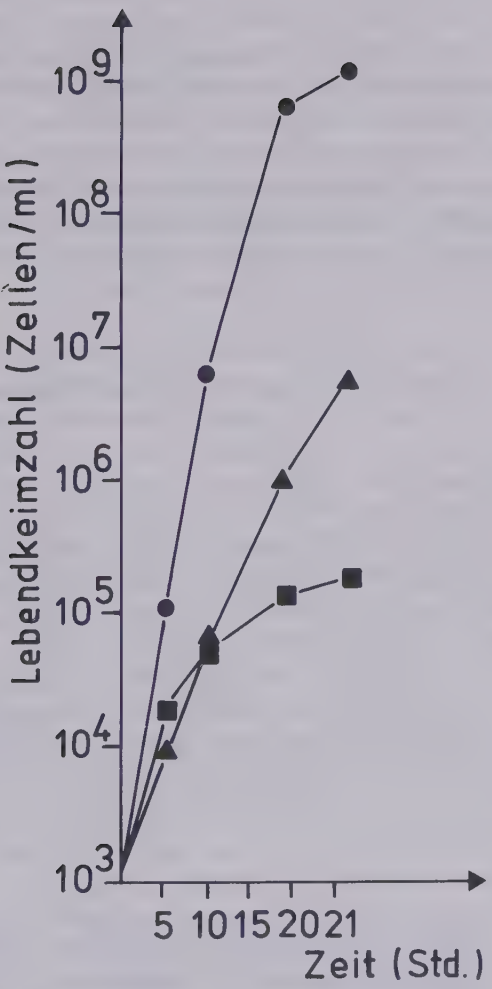

Abb. 4: Wachstum verschiedener fhuA Mutanten in Kälberserum: KÖ31 (●), K311/1101 (▲), BR707 (■).

3.1.3.3. Wachstum von Synthesemutanten in Kälberserum

Durch Insertion von Tn5-Transposons oder Mu-Phagen (d1) im Synthesegenbereich sind diese Stämme nicht mehr in der Lage Aerobactin herzustellen. Diese Mutanten (EN41, WO916, K311/1107, ZI346, ZI350) erreichten in Kälberserum in 25 Std. Zelldichten zwischen ca. 6×10^4 und 10^6 Zellen/ml - wuchsen somit besser als Transportmutanten (Abb.3).

3.1.3.4. Wachstum von fhuA Mutanten in Kälberserum

Mutationen in fhuA sollen je nach Art der Mutation einen mehr oder weniger polaren Effekt auf fhu CDB und damit auf das Aerobactinsystem zeigen (22). Dies konnte durch Wachstumsversuche mit verschiedenen fhuA Mutanten bestätigt werden. Der Stamm KÖ31 mit einer Punktmutation in fhuA, bei der nur die Funktion des Rezeptorproteins betroffen war, wuchs in Serum ungehindert, während die anderen getesteten Stämme (K311/1101 und BR707) doch im Wachstum beeinträchtigt waren (Abb. 4).

3.1.3.5. Wirkung verschiedener klonierter ColV-Plasmidbereiche auf das Wachstum in Kälberserum

E.coli GR19 trägt neben dem ColV-K311-Plasmid mit defektem Aerobactinsynthesegen das Plasmid pRG12, das, abgesehen von iut, dem Gen für den Rezeptor

in der äußeren Membran, alle Aerobactingene besitzt (57). Dieser Stamm erreichte in 25 Std. - wie Stämme mit einem vollständigen ColV-Plasmid - eine Zelldichte von mehr als 10^8 Zellen/ml (Abb. 5).Das defekte Synthesegen scheint also durch pRG12 komplementiert zu werden.

Der Stamm GR24 enthält das Plasmid pRG1, das aus dem gesamten Aerobactingenbereich und einem Drittel des ColV-Plasmids besteht (57). Obwohl alle Aerobactingene vorhanden waren, wuchs dieser Stamm in Kälberserum deutlich schlechter als GR19 (Abb. 5). Diesem Plasmid scheint also ein Faktor, der neben dem Aerobactinsystem mit zu voller Wachstumsstimulierung führt, zu fehlen.

Auf der Suche nach einem solchen Faktor, der auf dem ColV-Plasmid außerhalb des Aerobactingenbereiches lokalisiert sein könnte, wurde das Wachstum der Stämme 5K31 und GR35 in Kälberserum untersucht. Eventuell regt so ein Faktor das Zellwachstum auch ohne Wirkung von Aerobactin etwas an.
E.coli 5K31 enthält das Plasmid pRG31, das den Genbereich für Colicin V einschließlich des benachbarten iss Genes - dieses soll nach Binns (13,14) erhöhte Überlebenschancen in frischem Serum bewirken - kloniert trägt. Die Frage war, ob iss vielleicht dem gesuchten Faktor entspricht, d.h. daß iss dann nicht nur gegen die Complementwirkung schützen, sondern auch bei inaktiviertem Complementsystem das Zellwachstum fördern würde.
E.coli GR35 enthält das Plasmid pRG26, auf dem der Genbereich (8-10 kb) links des Aerobactinbereiches kloniert ist.
Beide Stämme konnten in Kälberserum nicht wachsen. Sie erreichten beide kaum 4×10^3 Zellen/ml, die Zelldichte nahm nach 5 - 10 Stunden bereits wieder stark ab (ohne Abb.). Entweder trägt keiner der

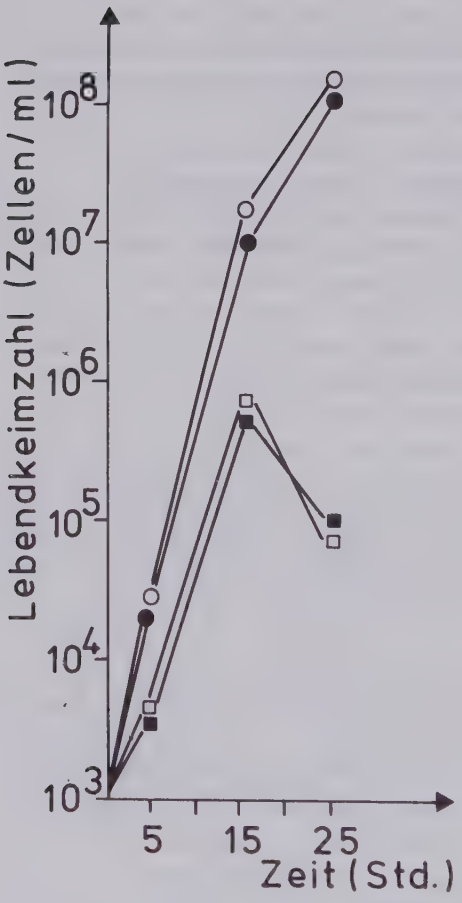

Abb. 5: Wachstum von E.coli K-12 GR19 (●,○) und GR24 (■,□) in Kälberserum mit und ohne inaktiviertem Complementsystem.
(Offene Symbole: nicht inaktiviertes Complementsystem
geschlossene Symbole: inaktiviertes Complementsystem)

beiden klonierten ColV-Plasmidbereiche den gesuchten Faktor, oder der Faktor wirkt sich ohne intaktes Aerobactinsystem nicht auf das Bakterienwachstum in Serum aus. Unter den hier gewählten Bedingungen (siehe 2.10.2.) zeigte also auch iss nicht die beschriebene Serumresistenz.

3.1.4. Wachstum von Synthesemutanten bei Zugabe von Desferriaerobactin in Kälberserum

Eine weitere Frage war, ob Zellen nur selbst ausgeschiedenes und eventuell an die Zelle gebundenes Aerobactin für ihre Eisenversorgung nützen können oder ob Aerobactin unabhängig von seiner Herkunft das Wachstum in Serum fördert.

Deshalb wurde Desferriaerobactin zur Serumkultur gegeben und das Wachstum einer Synthesemutante (EN41) bestimmt.
Der Stamm konnte das "freischwimmende" Aerobactin über das intakte Transportsystem aufnehmen, genauso wie ein Stamm, der es selbst ausscheidet: nach 25 Std. betrug die Zelldichte 4 x 10^8 Zellen pro ml (Abb. 6).

3.1.5. Auswirkung des intakten Complementsystems von Kälberserum auf das Wachstum von E.coli

Das Complementsystem stellt einen der effektivsten Abwehrmechanismen dar, mit denen sich eindringende

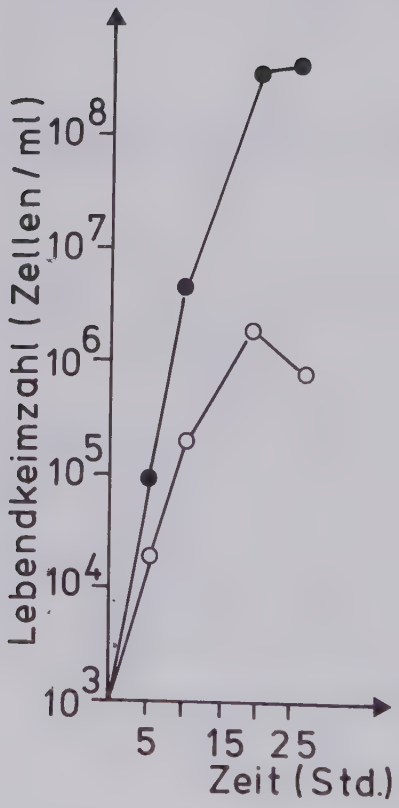

Abb. 6: Wachstum von E.coli K-12 EN41 aer in Kälberserum mit 1,6 µM Desferriaerobactin (●) und ohne dieses (○).

Mikroorganismen im Serum auseinandersetzen müssen (140).

Um die Auswirkung des Complementsystems des Kälberserums und eventuelle Serumresistenzen von E.coli-Stämmen dagegen herauszufinden, wurde das Wachstum verschiedener E.coli-Stämme (H647, H1422, GR19, GR24) in Kälberserum mit inaktiviertem und nicht inaktiviertem Complementsystem bestimmt.

Alle untersuchten Stämme wuchsen unter beiden Bedingungen gleich gut oder schlecht. So erreichte z.B. H647 auch bei nicht inaktiviertem Complementsystem nach 25 Std. Wachstum fast 10^9 Zellen/ml und H1422 nicht ganz 10^4 Zellen/ml (ohne Abb.). Auch bei den Stämmen GR19 und GR24 bewirkte das intakte Complementsystem keine Wachstumsminderung (Abb.5).

3.1.6. Wirkung des Aerobactinsystems in Humanserum

In Kälberserum waren Zellen mit Eisenaerobactin-Aufnahmesystem eindeutig im Vorteil. Hier sollte nun überprüft werden, ob die erzielten Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind - d.h. ob die Stämme, die Aerobactin synthetisieren und aufnehmen können, in Humanserum ebenfalls besser wachsen können als andere ohne intaktes Aerobactinsystem. Daher wurde, wie im Kälberserum, das Wachstum verschiedener ColV-Plasmid tragender Stämme, sowie Transportmutanten und Stämme ohne pColV bestimmt.

Im Vergleich zu den beiden letzteren (Transportmutanten und plasmidlose Stämme, ca. 10^4 Zellen/ml) wuchsen auch in Humanserum die Stämme mit intaktem

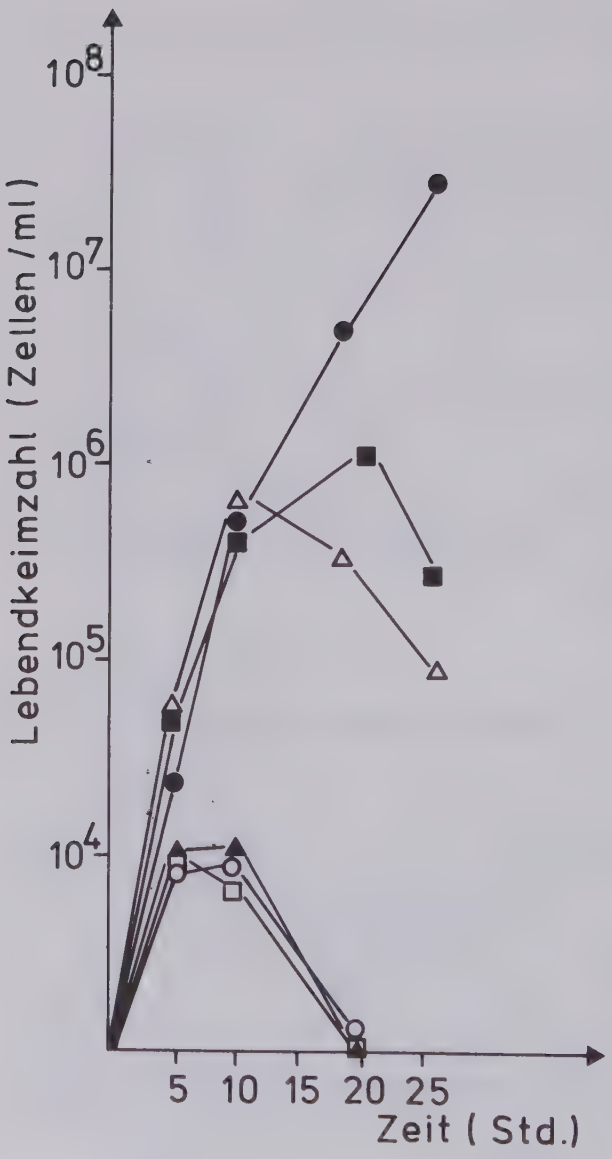

Abb. 7: Wachstum verschiedener E.coli K-12 Stämme in Humanserum (Complementsystem inaktiviert): H647 (△), BR689 (■), EN775 (●), BR688 (○), BR703 (▲) und H1422 (□).

Aerobactinsystem deutlich besser. Dennoch erreichten - mit Ausnahme von EN775 (3×10^7 Zellen/ml) - diese Stämme bei weitem nicht die gleichen hohen Zelldichten wie in Kälberserum. Meist nahm die Zelldichte nach 10 Std. sogar wieder ab (Abb. 7).
Es schien so, daß Zellen mit einem Stammhintergrund von E.coli H1422 (z.B. H647, BR689) unabhängig von der Herkunft des ColV-Plasmids in Humanserum schlechter wachsen als die mit einem Hintergrund von E.coli H1443 (z.B. EN775).

Tabelle 1

Eisenkonzentration und Eisenbindungskapazitäten von Kälberserum und Humanserum (s.2.8. und 2.9.)

	Kälberserum	Humanserum
Serumeisenkonzentration	286 µg/dl	214 µg/dl
Freie Eisenbindekapazität	183 µg/dl	179 µg/dl
Totale Eisenbindekapazität	469 µg/dl	393 µg/dl
Eisensättigung des Transferrins	39 %	45,5 %

3.1.7. Eisensättigung des Transferrins in Kälberserum und Humanserum

Zur Bewertung der Wachstumsversuche war es von Interesse, den Grad der Eisensättigung des Transferrins zu kennen. Dafür wurden in Kälberserum und Humanserum, die bei den Wachstumsversuchen verwendet wurden, die Serumeisenkonzentration, sowie die freie Eisenbindungskapazität bestimmt (Tab. 1). In Kälberserum war das Transferrin zu 39 % mit Eisen gesättigt, im Humanserum zu 45,5 %. Der Literaturwert für Humanserum liegt bei 30 - 40 %, also etwas niedriger als die hier bestimmten Werte (10).

3.1.8. Ausprägung des Eisenmangels in Zellen, die in Serum gezüchtet wurden

Weiter stellte sich die Frage, ob Zellen, auch wenn sie über Aerobactin mit Eisen versorgt werden, in Serum trotzdem unter Eisenmangel stehen.
Um dies herauszufinden, wurde von Stämmen, die den Phagen Mu dl (Ap lac) in einem eisenregulierten Gen inseriert trugen, die Expression der ß-Galactosidase, bei Züchtung der Zellen in Kälberserum, bestimmt. Außerdem wurden neben Wachstumsmessungen äußere Membranen der Zellen isoliert und elektrophoretisch in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

Unter Eisenmangel werden die eisenregulierten Gene verstärkt exprimiert, d.h. die ß-Galactosidase-Aktivität ist erhöht und die entsprechenden Proteine der äußeren Membran sind deutlich ausgeprägt.

Die in Tab. 2 aufgeführten Werte zeigen eine starke Expression der ß-Galactosidase bei den Stämmen EN775 x H1365 und ZI351. ZI351 konnte aufgrund der Insertion von Mu (Ap lac) in iut kein Aerobactin transportieren und stand daher unter starkem Eisenmangel, was sich auch darin äußerte, daß der Stamm in Kälberserum nicht wachsen konnte (max. ca. 10^4 Zellen/ml).Bei EN775 x H1365 schien trotz intaktem Aerobactinsystem und gutem Wachstum in Kälberserum (5 x 10^8 Zellen/ml in 25 Std.) doch nur so wenig Eisen in die Zelle zu gelangen, daß das cir Gen und damit die ß-Galactosidase stark exprimiert wurde.

Im Falle von EN775 x H1594 war die ß-Galactosidase-Aktivität deutlich geringer. Im Vergleich zur Kontrolle, bei der der Stamm in eisenreichem TY-Medium gezüchtet worden war, war die Expression der ß-Galactosidase und damit des fiu Genes jedoch um den Faktor 3 höher. Ähnliche ß-Galactosidase-Aktivitäten wurden bei anderen Stämmen mit fiu :: Mu dl unter Eisenmangel angegeben (67). Entgegen der Erwartung konnte durch Zugabe von 100 µM $FeCl_3$ zum Kälberserum die ß-Galactosidase-Aktivität nicht gesenkt werden, sondern war eher leicht erhöht (Tab.2). Eventuell wurde fast alles $FeCl_3$ an Transferrin gebunden, so daß die Zellen trotzdem unter relativem Eisenmangel standen. Dafür sprach auch die gelelektrophoretische Auftrennung der äußeren Membran: bei beiden Proben (EN775 x H1594 in KS mit und ohne Zusatz von $FeCl_3$) waren die "Eisenproteine" in gleichem Maße augeprägt. Ihre Bandenstärke entsprach auch den Banden der entsprechenden Proteine der Stämme ZI351 und EN775 x H1365, die in Kälberserum eindeutig unter Eisenmangel gestanden hatten (Abb.12, S.62).

Der in Kälberserum bestehende Eisenmangel wurde auch dadurch gezeigt, daß die *fur* Mutante BR751 mit dereprimiertem Aerobactinaufnahmesystem in diesem Serum keine höhere Wachstumsrate aufwies als Stämme mit intaktem *fur* Gen: der Eisenmangel in Serum hatte bereits eine Derepression bewirkt.

Tabelle 2: ß-Galactosidase-Aktivität (Mu d1) unter Kontrolle der Eisenversorgung von E.coli-Stämmen

Stamm	Mu d1 inser.in	Zellen gez.in	ß-Galactos. Aktivität
EN775 x H1365	*cir*	KS	266 (± 45)
EN775 x H1594	*fiu*	KS	61 (± 10)
EN775 x H1594	*fiu*	KS + $FeCl_3$	86 (± 4)
EN775 x H1594	*fiu*	TY	23 (± 0)
H1594	*fiu*	TY	19 (± 1)
ZI351	*iut*	KS	289 (± 50)

Die Bestimmung der ß-Galactosidase-Expression wurde nach 2.16. durchgeführt. Ausgegangen wurde von TY-Übernachtkulturen mit Zusatz von 15 µg/ml Tet bei Stämmen mit pColV und von 25 µg/ml Amp. bei allen Stämmen. In der Tabelle sind Mittelwerte von 2-4 Werten angegeben. $FeCl_3$ wurde in einer Konzentration von 100 µM zum Kälberserum gegeben.

3.2. Gewinnung von Eisen mit Hilfe des Enterochelin-Eisenaufnahmesystems

3.2.1. Wirkung des Enterochelinsystems auf das Wachstum in synthetischem Medium

Enterochelin ist ein starker Eisenkomplexbildner, der, nach seiner Assoziationskonstante beurteilt, in der Lage sein sollte, dem Transferrin das Eisen zu entreißen (32,114). Ob dies tatsächlich der Fall ist, sollte hier anhand von Wachstumsversuchen herausgefunden werden.

In M9-Medium mit 30 µM Transferrin, das zu ca. einem Drittel mit Eisen besetzt worden war (siehe 2.7), und mit 18 mM Bicarbonat wurde das Wachstum von aroB Stämmen (mit defekter Enterochelinsynthese) untersucht. Dabei sollte festgestellt werden, ob die Zugabe von DHB - einem Zwischenprodukt der Enterochelinsynthese - das Wachstum der Zellen fördert.
E.coli AB2847 erreichte nach 25 Std. eine Zelldichte von ca. 10^4 - 10^5 Zellen/ml, nach 40 Std. waren es nur noch 6 x 10^3 Zellen/ml. Wurde dem Medium jedoch DHB (20µM) zugegeben, so wuchsen die Zellen deutlich besser: nach 25 Std. betrug die Zelldichte 3 x 10^8 Zellen/ml, nach 40 Std. sogar mehr als 10^9 Zellen/ml. Zellen, die Enterochelin ausschieden, besaßen also einen klaren Wachstumsvorteil gegenüber denen, die nicht dazu in der Lage waren (Abb. 8).

Mit Wachstumsmessungen, die im Biophotometer aufgezeichnet wurden, konnten entsprechende Ergebnisse erzielt werden.

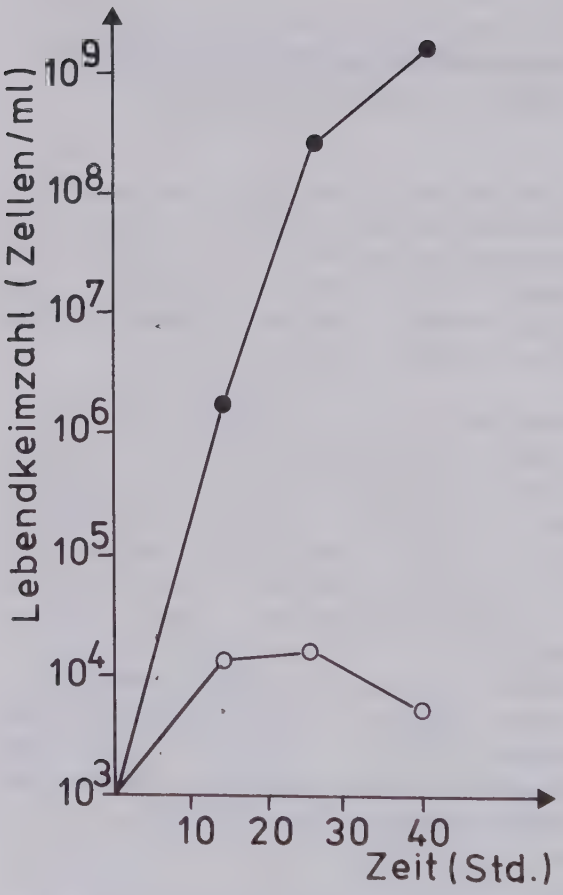

Abb. 8: Wachstumskurven von E.coli AB2847 mit 30µM Transferrin, das zu 1/3 mit Eisen gesättigt war, und mit 18 mM Bicarbonat: ohne weiteren Zusatz (○) und mit 20µM DHB (●).

3.2.2. Untersuchungen des Wachstums mit Hilfe des Enterochelinssystems in Kälberserum

Um Aussagen über eine eventuelle virulenzsteigernde Wirkung des Enterochelinssystems machen zu können, war es wichtig zu erfahren, ob auch in Serum Zellen, die Enterochelin ausscheiden, besser mit Eisen versorgt werden und Wachstumsvorteile besitzen. Interessant war ferner, wie sich das Enterochelin - Eisenaufnahmesystem neben einem intakten Aerobactin - Eisenaufnahmesystem auswirkt.

3.2.2.1. Wachstum in Kälberserum bei Zufütterung von DHB

Verschiedene aroB$^-$ Stämme wurden in Kälberserum mit bis zu 200 µM DHB gezüchtet. Es wurde die bis zum zehnfachen der sonst üblichen Menge an DHB (20 µM) zugegeben, da der Eindruck entstanden war, daß eventuell ein Teil des DHB gar nicht in die Zelle gelangt, sondern an Serumbestandteile adsorbiert.

Anders als im synthetischen Medium bewirkte das aus DHB synthetisierte und ausgeschiedene Enterochelin in Kälberserum weder bei den plasmidfreien Stämmen H1422, AB2847 und BR741 noch bei dem pColV tragenden, cloacinresistenten Stamm BR688 ein verbessertes Wachstum. Wurde als Kontrolle dem Serum jedoch $FeCl_3$ (100 µM) zugefügt, so konnte H1422 ungehindert wachsen - wie Stämme mit intaktem Aerobactintransportsystem (Abb. 9).

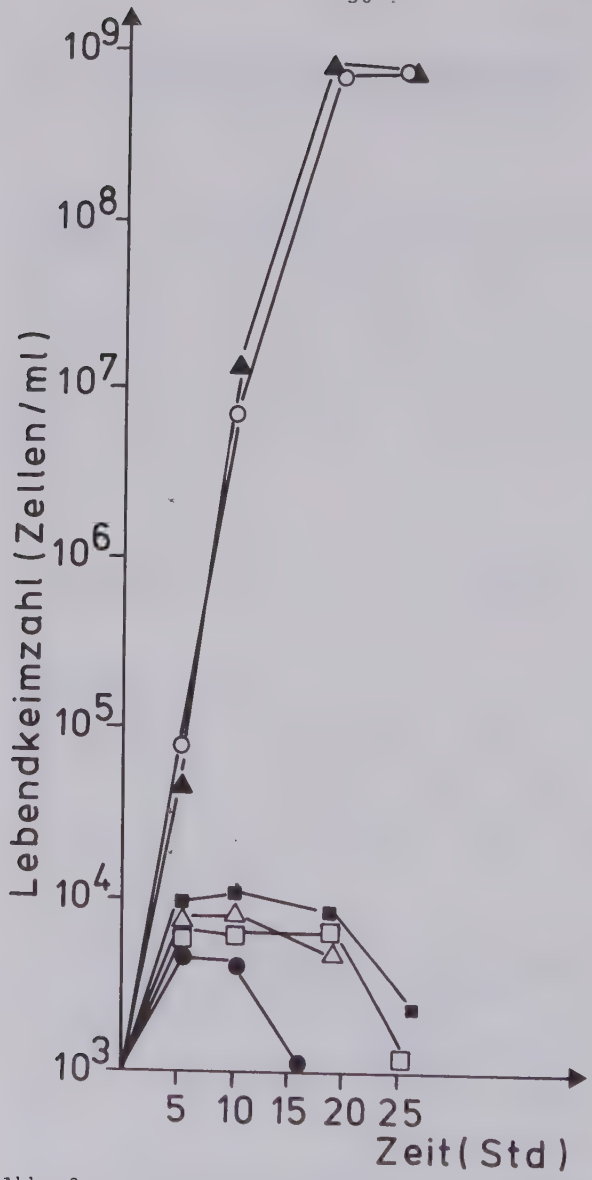

Abb. 9: Wachstum von E.coli K-12 Stämmen in Kälberserum. aroB$^+$ Stämme wurden ohne Zusatz von Eisenkomplexbildnern gezüchtet; aroB$^-$ Stämmen wurde $FeCl_3$, DHB bzw. Citrat ins Medium zugegeben: WO910 aroB$^+$, pColV (▲); CB688 aroB$^+$, pColV iut (●); BR688 aroB$^-$, pColV iut, Zusatz von 200 µM DHB (△); H1422 aroB$^-$, Zusatz von 200 µM DHB (□), 5 mM Citrat (■) bzw. nur 100 µM $FeCl_3$ (○).

3.2.2.2. Wachstum von aroB$^+$ Stämmen in Kälberserum

Um die obigen Ergebnisse mit Stämmen, die keinen Defekt in der Aromatensynthese aufweisen, zu überprüfen, wurde verschiedenen aroB$^-$ Stämmen das aroB Gen durch P1 - Transduktion übertragen. Die gewünschten Stämme wurden auf aroB-Testplatten isoliert (z.B. CB1422, CB688). Einige aroB$^+$ Stämme waren schon vorhanden (MC4100, EN777, W3110). Doch keiner der enterochelinausscheidenden Stämme (z.B. CB1422, CB688, WO910, MC4100) war in der Lage, in Serum besser zu wachsen als die entsprechenden aroB$^-$ Mutanten (H1422, BR688, BR689, H1443) (Abb. 2, 3 und 9).

Es war also auch nicht von Bedeutung, ob der jeweilige Stamm kein Plasmid, ein ColV-Plasmid mit intaktem Aerobactinsystem oder ein ColV-Plasmid mit Defekt im iut Gen besaß: in Serum konnte das Enterochelin keine bessere Eisenversorgung der Zellen bewirken und hatte keinen Einfluß auf den Eisentransport über das Aerobactinsystem.

3.3. Eisenversorgung über das Eisen-Dicitrat - transportsystem

Als weiteres Eisenaufnahmesystem war das citratabhängige Eisentransportsystem zu beachten. Es muß durch Eisen(III)citrat von außen induziert werden (80,164). Humanserum enthält 0,1 mM Citrat, was theoretisch für eine Induktion ausreichen sollte. Weiter stellte sich jedoch auch hier die Frage, ob Citrat das Eisen vom Transferrin loslösen kann, so

daß eine Induktion des Transportsystems und eine Aufnahme in die Zelle möglich werden.

3.3.1. Induktion des FecA - Rezeptorproteins

Äußere Membranen verschieden gezüchteter E.coli-Stämme wurden über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Wenn das Eisencitratsystem induziert war, trat im Bandenmuster eine kräftige Bande des FecA-Proteins (80K) auf. Am besten eigneten sich dazu fepA Mutanten wie z.B. der Stamm BR10, da ihnen das direkt über FecA liegende FepA-Protein fehlt, was die Interpretation der Bandenmuster erleichterte.

Zunächst wurden Membranen von Zellen, die in synthetischem Medium gewachsen waren, aufgetrennt: Die deutlichen Banden der eisenabhängigen Rezeptorproteine zeigten, daß die in extrahiertem M9-Medium mit Eisentransferrin gezüchteten Zellen unter Eisenmangel gestanden hatten. Das unabhängig induzierbare FecA-Protein trat verstärkt in der äußeren Membran auf, wenn die Kulturen Citrat (100 µM) enthalten hatten, während ohne Citrat nur wenig FecA-Protein in dieser Membran zu finden war (Abb. 10). Ohne Eisentransferrin im Medium war dieser Unterschied doch deutlicher: die FecA-Bande war, obwohl insgesamt weniger Protein aufgetragen worden war, genauso kräftig (Abb. 10: 5, 6).

Außerdem wurden Membranpräparate von Zellen, die in Human-, Rinder- bzw. Kälberserum gezüchtet worden waren, elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden hauptsächlich äußere Membranen der Stämme BR10, AB2847, WA1024 und einige pColV tragende Stämme benutzt. Bei den meisten SDS-PAGE trat das

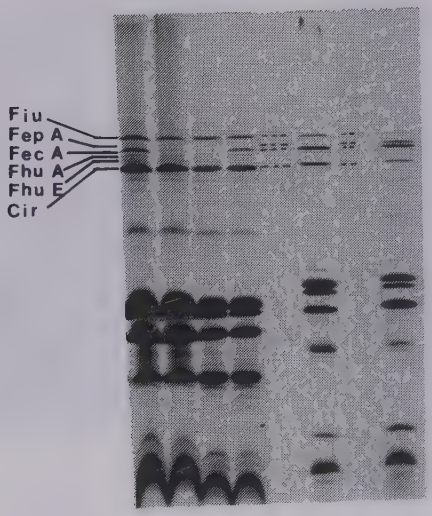

Abb. 10: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der äußeren Membran von E.coli K-12 BR10 und AB2847.
Die Zellen waren in extrahiertem M9-Medium mit 18 mM Bicarbonat gewachsen. Ein Teil der Kulturen enthielt außerdem 30 µM Transferrin, das zu 1/3 mit Eisen gesättigt war (1-4) und als Eisenkomplexbildner 100 µM Citrat (1, 4, 5, 6).
Proben:

1 BR10; M9-Medium mit Fe-Tr, mit Cit.; 23 µg Protein aufgetragen
2 BR10; M9-Medium mit Fe-Tr, ohne Cit.; 23 µg Protein aufgetragen
3 BR10; M9-Medium mit Fe-Tr, ohne Cit.; 9,3 µg Protein aufgetragen
4 BR10; M9-Medium mit Fe-Tr, mit Cit.; 9,3 µg Protein aufgetragen
5 BR10; M9-Medium ohne Transf.,mit Cit. 5,2 µg Protein aufgetragen
6 AB2847; M9-Medium ohne Transf., mit Cit.; 2,7 µg Protein aufgetr.

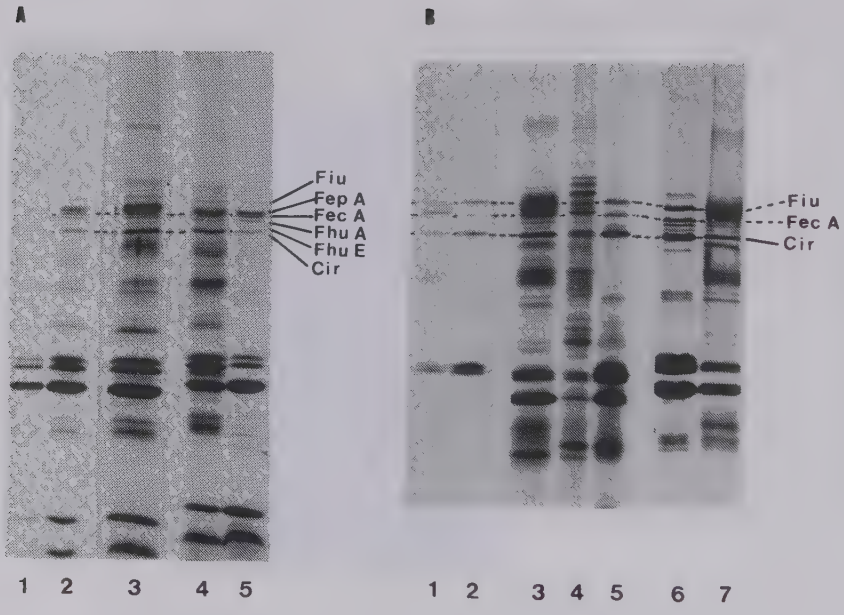

Abb. 11: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der äußeren Membran.
Die Zellen waren im Vergleich zu extrahiertem M9-Medium mit 30 µM Eisentransferrin (1/3 bes.), 18 mM Bicarbonat und 100 µM Citrat in Humanserum (12A) und Rinderserum (12B) gewachsen. Die Zellen wurden vor der Membranpräparation (n.2.11.) in Saline und 0,2 M Tris/HCl gewaschen.

Proben:

11A: 1-4	BR10,	in Humanserum gez. verschiedene Membranpräparationen
5	AB2847,	in M9-M. mit Fe-Tr und Cit. gezüchtet.
11B: 1 u.4	WA1024,	in Rinderserum gez. versch. Membr.präp.
2,5,6	BR10,	in M9-M. mit Fe-Tr und Cit. gezüchtet, versch. Membr.präp.
3 u.7	BR10,	in Rinderserum gez. versch. Membr.präp.

Problem auf, daß auf dem Gel verschmierte Bereiche und Banden, vor allem im 80K Bereich,erschienen, die trotz mehrmaligen Waschens der in Serum gewachsenen Zellen mit Saline und 0,2 M Tris/HCl nicht beseitigt werden konnten. Diese Störfaktoren rührten wahrscheinlich von Serumproteinen her, die - an der Zelloberfläche angelagert - nicht abwaschbar waren. Wie auf Abb. 11A zu sehen ist, trat bei den Membranpräparaten von BR10 - in Humanserum gezüchtet und in verschiedenen PAGE aufgetrennt - auf der Höhe des fehlenden FepA-Proteins stets eine ‚kräftige, leicht verschmierte Bande auf, deren Herkunft nicht geklärt werden konnte. Die knapp darunterliegende Bande könnte vom FecA-Protein stammen. Dies konnte jedoch nicht bewiesen werden.

Etwas anders sah das Bandenmuster aus, wenn die Zellen in Rinderserum gezüchtet worden waren: der Bereich um 80K war stärker verschmiert, doch hoben sich davor scharfe Banden deutlich ab (Abb. 11B). Klar zu identifizieren war das Cir-Protein in allen Proben. Beim Vergleich der Banden der in Rinderserum gewachsenen Zellen (BR10 *fepA* und WA1024 *fepA fecA*) mit denen von BR10, in M9-Medium gewachsen, schien die obere, sich im verschmierten Bereich abhebende Bande dem Fiu-Protein zu entsprechen; die andere, unterhalb liegende Bande lag bei BR10 (aus Rinderserum) etwa auf der Höhe von FecA, stammte also vielleicht von diesem Protein. Dafür sprach, daß WA1024 auf gleicher Höhe keine Bande aufwies. Bei WA1024 trat eine Bande unmittelbar oberhalb der FecA-Bande auf. Vom FepA-Protein konnte sie aufgrund der *fepA* Mutation des Stammes nicht stammen. Eventuell handelte es sich hier - wie vielleicht auch bei der vermuteten FecA-Bande von BR10 - um ein an der Zelloberfläche angelagertes Serumprotein. Elektrophoretisch aufgetrenntes Serum zeigte neben einer Hauptbande

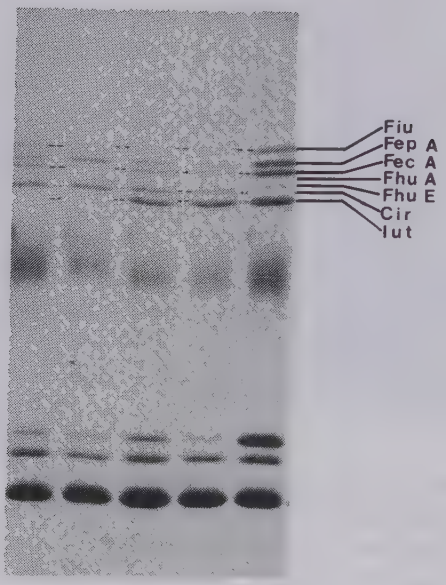

Abb. 12: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen der äußeren Membran aus verschiedenen E.coli K-12 Stämmen.

Proben:

1	ZI351 pColV-K311 iut::Mu d1
2	AB2847
3 u. 4	H1594 x EN775 fiu::Mu d1, pColV-K311
5	H1365 x EN775 cir::Mu d1, pColV-K311

Die Zellen waren in Kälberserum gewachsen. Probe 3 enthielt außerdem 100 µM $FeCl_3$. Die geernteten Zellen wurden in 0,1 % SDS gewaschen.

bei 67K von Albumin dünnere Banden auch im 80K-Bereich, die für diese undefinierten Banden verantwortlich sein könnten. Eventuell könnte anhand von Autoradiographien von Polyacrylamidgelen, in denen radioaktiv markierte Zellproteine aufgetrennt sind, die Herkunft der Banden besser festgestellt werden.
Später wurde bei in Kälberserum gezüchteten Zellen auf andere Weise versucht, die Serumreste von der Oberfläche der Zellen abzulösen: die Zellen wurden mit 0,1 % SDS gewaschen. Zwar waren noch Albuminreste in den Membranpräparaten enthalten, doch der 80K-Bereich wurde nicht mehr gestört. Bei den ColV-Plasmid enthaltenden Stämmen (EN775 x H1365, EN775 x H1594, ZI351) war das FecA-Protein eindeutig erkennbar. Entgegen den Erwartungen fehlte diese Bande jedoch bei AB 2847 (Abb. 12). Diese Tatsache war nicht erklärbar. Es erschien unwahrscheinlich, daß das Citrateisen- Transportsystem nur bei Stämmen, die ein ColV-Plasmid - intakt oder mutiert - besitzen,induziert wird.

3.3.2. Transport von ^{55}Fe-Citrat

Das gleiche Ziel - nämlich festzustellen, ob das citratabhängige Eisentransportsystem bei Eisenmangel in Gegenwart von Transferrin induziert wird - wurde verfolgt, indem der Transport von radioaktiv markiertem Eisencitrat gemessen wurde.

Wenn Citrat (100 µM) im Kulturmedium (M9-Medium) enthalten war, so wurden - unabhängig von Eisentransferrin - in 15 Min. ca. 150 pmol ^{55}Fe/mg TG von den Zellen (BR10) aufgenommen (Abb. 13). Wurden die Zellen ohne Citrat gezüchtet, so gelangte nur ein Bruchteil des markierten Eisens

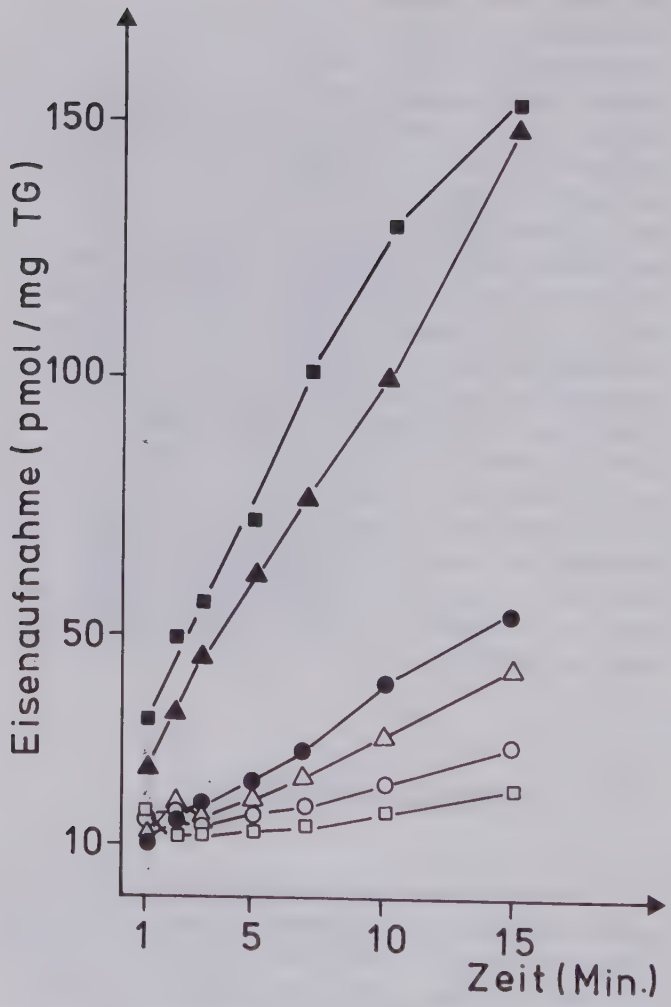

Abb. 13: Citratabhängige Eisenaufnahme bei E.coli BR10 nach Wachstum in verschiedenen Medien:

- ■ M9-Medium mit 100 µM Citrat
- ▲ M9-M. mit 30 µM Fe-Tr (1/3 ges.), 18 mM Bicarbonat und mit 100 µM Cit.
- □ M9-Medium
- △ M9-M. mit 30 µM Fe-Tr (1/3 ges.) und 18 mM Bicarbonat
- ● Rinderserum
- ○ Kälberserum

in die Zellen: nach 15 Min. hatten Zellen, die mit Eisentransferrin gezüchtet waren, ca. 45 pmol ^{55}Fe/mg TG und Zellen, die ohne Transferrin gezüchtet waren, 21 pmol ^{55}Fe/mg TG in ihr Zellinneres transportiert. Auch der Eisencitrat-Transport in Zellen, die in Serum (Rinderserum, Kälberserum) gewachsen waren, spielte sich in diesem Bereich unter 55 pmol/mg TG ab, wobei in Kälberserum gezüchtete Zellen nur etwa halb soviel Eisen aufnahmen wie die in Rinderserum gezüchteten. Im Vergleich zum guten Eisentransport von 150 pmol/mg TG waren die hier aufgeführten Unterschiede doch gering, so daß nicht mehr darauf eingegangen wurde.

3.3.3. Wachstum mit Eisencitrat

3.3.3.1. Wachstum in synthetischem Medium

Ergänzend zu Gelelektrophoresen und Transportversuchen wurde auch das Wachstum mit Citrat als Eisenkomplexbildner gemessen. In extrahiertem M9-Medium mit Eisentransferrin und Bicarbonat wurde die Lebendkeimzahl oder die optische Dichte von Kulturen verschiedener aroB Mutanten bestimmt. Diese Stämme konnten also kein Enterochelin synthetisieren und waren auf die Eisenversorgung über das Eisencitrat-Transportsystem angewiesen. Dem M9-Medium mit Eisentransferrin (1/3 mit Eisen beladen) wurden verschiedene Mengen an Citrat zugegeben. Dabei zeigte sich, daß in Gegenwart von Transferrin, die sonst ausreichenden 100 µM Citrat für gutes Wachstum nicht genug waren: in 20 Std. erreichten die Kulturen eine Zelldichte von ca.

10^6 Zellen/ml und zeigten nach 40 Std. noch keine erkennbare Trübung (OD_{578} 0,02). Erst bei einer Zugabe von 500 µM Citrat war ein deutlich besseres Wachstum zu erkennen: nach 20 Std. Inkubation enthielten die Kulturen ca. 5 x 10^7 Zellen/ml und nach 40 Std. waren sie stark getrübt (OD_{578} 1,7 = 1-2 x 10^9 Zellen/ml) (Abb. 14). Mit E.coli BR10 wurden die gleichen Ergebnisse erzielt wie mit dem hier gezeigten Stamm AB2847.

Erwartungsgemäß ließ sich das Wachstum von fecA und fecB Mutanten (WA380, WA38) in diesem Medium nicht mit Citrat stimulieren. Sie erreichten kaum höhere Zelldichten als Stämme mit intaktem Transportsystem, die ohne Citrat gezüchtet wurden (Abb. 14).

War das zugegebene Transferrin ganz mit Eisen beladen oder wenn noch 5 µM Eisen im Überschuß zugegeben wurden, erreichten die Kulturen von BR10 bei Zugabe von Citrat Zelldichten von 10^8 - 10^9 Zellen/ml; doch auch ohne Citrat konnten um die 10^7 - 10^8 Zellen/ml gezählt werden.

Das extrahierte M9-Medium schien nur noch so wenig Eisen zu enthalten, daß die Kontrollkultur (AB2847) ohne Eisentransferrin, obwohl Citrat zugefügt wurde, ziemlich schlecht wuchs. Das heißt, daß auch mit Hilfe des Eisenkomplexbildners nicht genug Eisen in die Zellen gelangen konnte. Daraufhin wurden diese Kontrollkulturen ohne Transferrin mit einem Zusatz von 5nM $FeCl_3$ (zum Wachstum ohne Chelator wären 0,1 - 1 µM Eisen notwendig) gezüchtet. So konnten die Zellen mit Citrat wachsen, ohne Citrat jedoch nicht (Abb. 14).

Zu Beginn der Arbeit war das Wachstum im Biophotometer über die optische Dichte gemessen worden.

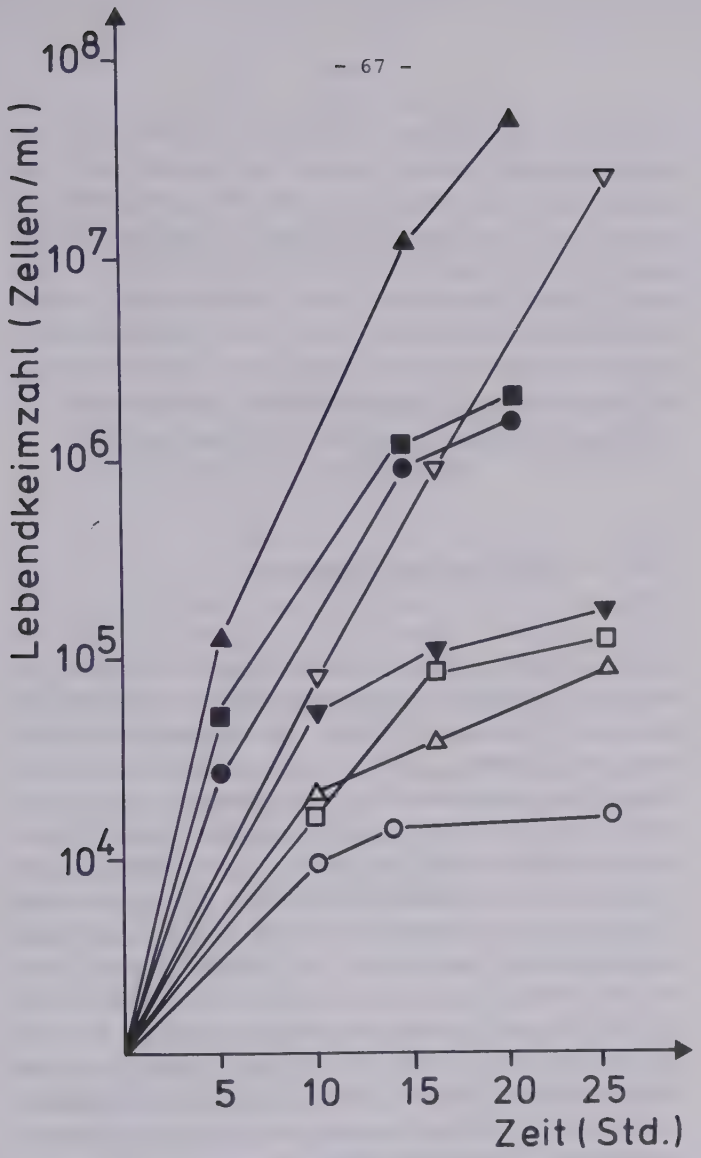

Abb. 14: Wachstumskurven von E.coli K-12 in M9-Medium bei Eisenversorgung über das Citrateisen-Transportsystem. Wenn nicht anders angegeben, enthielt das Medium 30 µM Transferrin - zu 1/3 mit Eisen gesättigt - und 18 mM Bicarbonat: AB2847 mit Zusatz von 500 µM Cit. (▲), 300 µM Cit. (■), 100 µM Cit. (●) bzw. ohne Zusatz eines Eisenkomplexbildners (○); WA380 (▼)und WA38 (□) mit Zusatz von 100 µM Cit.; AB2847 in M9-Medium ohne Transferrin, ohne Eisenkomplexbildner mit Zusatz von 5 nM $FeCl_3$ (△), sowie ohne Transferrin mit Zusatz von 100 µM Cit. und 5 nM $FeCl_3$ (▽).

Die Ergebnisse zeigten die gleiche Tendenz wie die oben erwähnten, waren jedoch bei weitem nicht in diesem Maße reproduzierbar. Es war nicht möglich gewesen in den Küvetten stets so großen Eisenmangel zu bekommen: wahrscheinlich traten aus den Rührstäbchen Eisenionen durch feine Risse in der Teflonbeschichtung nach außen (z.T. konnten Rostspuren entdeckt werden). Eventuell gelangten auch von den Alukappen beim Schütteln Eisenspuren ins Medium.

3.3.3.2. Wachstum in Kälberserum

Wie bei anderen Eisentransportsystemen interessierte vor allem, ob die Zellen auch in Serum in der Lage sind, sich über das Citratsystem mit Eisen zu versorgen. E.coli H1422 wurde in Kälberserum gezüchtet und die Lebendkeimzahl bestimmt (nach 2.10.2). Wie die Wachstumstests mit synthetischem Medium gezeigt hatten, reichten 100 µM Citrat neben Eisentransferrin für gutes Wachstum nicht aus. Dies zeigte sich auch bei den in 3.1.2 beschriebenen Versuchen, wo Stämme, die kein weiteres Eisentransportsystem besaßen, Eisen nicht mit Hilfe des in Kälberserum enthaltenen Citrats gewinnen konnten (Abb. 2). Daher wurden hier dem Serum größere Mengen Citrat - bis zu 5 mM - zugesetzt. Doch auch dadurch war keine Wachstumssteigerung zu erreichen (Abb. 9).

4. DISKUSSION

4.1. Auswirkung des citratabhängigen Eisentransportsystems in Eisentransferrin-haltigem Minimalmedium und Kälberserum

Es ist erwiesen, daß sich E.coli mit Hilfe von Citrat mit Eisen versorgen kann - über ein Aufnahmesystem, das durch Eisencitrat im Medium induziert werden muß (46,80,146). Dies legte die Vermutung nahe, daß dieses Eisencitratsystem auch in Serum, wo etwas mehr als die notwendigen 0,1 mM Citrat enthalten sind, eine Rolle spielen könnte bei der Gewinnung des transferringebundenen Eisens, das bei dem dort herrschenden Eisenmangel für infektiöse Mikroorganismen essentiell ist. Die Frage war, ob Citrat in der Lage ist, Eisen dem Transferrin zu entreißen. Laut Aisen sollte dies bei neutralem pH möglich sein (1,4).

In Eisentransferrin-haltigem, synthetischem Medium, das in seinen Konzentrationen den in Serum herrschenden Bedingungen angepaßt wurde, ist das Aufnahmesystem eindeutig durch 100 µM Citrat induzierbar, wie die SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen in 3.3.1. zeigen. Auch bei in Serum gezüchteten Zellen kann man wohl davon ausgehen - auch wenn die Ergebnisse hier nicht so klar interpretierbar waren - daß das Eisencitratsystem auch dort induziert wird.

Wenn auch das Aufnahmesystem induziert ist, ist

dadurch noch nicht gewährleistet, daß Eisen auch tatsächlich in die Zellen transportiert wird. Daher wurde in den obengenannten Medien Transport von radioaktivem Eisen über das citratabhängige Aufnahmesystem gemessen und das Wachstum der Zellen bestimmt.

Zellen, die in synthetischem Medium mit Eisentransferrin und 100 µM Citrat gezüchtet wurden, sind in der Lage, Eisen mit Hilfe von Citrat aufzunehmen - im Gegensatz zu den ohne Citrat gezüchteten. 100 µM Citrat reichen im gleichen Medium nur zu begrenztem Wachstum aus, erst ab 500 µM Citrat wachsen die Zellen gut. Zu gutem Wachstum in Gegenwart von Transferrin scheint also mehr Citrat notwendig zu sein als alleine für die Induktion des Eisenaufnahmesystems. Die Bezeichnung "gutes Wachstum" ist jedoch relativ und trifft für die hier gewählten Laborbedingungen zu. Inwieweit sich in vivo ein Organismus auch durch "begrenztes Wachstum" gegenüber seinem Wirt durchsetzen kann, ist hiermit jedoch nicht geklärt.

Auf jeden Fall ist in Gegenwart von Transferrin die Eisenversorgung über Citrat schwieriger als in reinem Eisenmangelmedium, jedoch kann Citrat, wenn es in erhöhter Konzentration vorliegt, eher Eisen vom Transferrin abziehen.
Obwohl in Serum das Eisencitratsystem induziert wird - davon soll hier ausgegangen werden - können darin gezüchtete E.coli Zellen weder Citrateisen aufnehmen noch wachsen, auch nicht bei Zugabe von 5 mM Citrat.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß irgendein serumspezifischer, von Transferrin wahrscheinlich unabhängiger Faktor die citratabhängige Eisenaufnahme und damit das Zellwachstum behindert.

Einen Hinweis könnten die SDS-Polyacrylamidgel-elektrophoresen geben: Dort wurden Serumproteine, die sehr schwer - nur mit 0,1 % SDS - von den Zellen ablösbar waren, beobachtet. Vermutlich besteht ein Zusammenhang zwischen dieser Proteinanlagerung und der behinderten Citrateisenaufnahme. Es wäre also möglich, daß eine solche Serumproteinanlagerung an die Zellen den Rezeptor der äußeren Membran auf irgendeine Weise beeinträchtigt, so daß zwar die Induktion durch Eisencitrat noch funktioniert, dieses aber nicht mehr in die Zellen transportiert werden kann. Griffith (54) berichtete von IgG Antikörpern gegen eisenregulierte Proteine der äußeren Membran, konnte jedoch deren Wirkung nicht näher beschreiben. Vielleicht treten solche Antikörper auch in Wechselwirkung mit dem FecA Protein. Vorstellbar sind auch gegen andere Zelloberflächenstrukturen (wie z.B. LPS) gerichtete Antikörper.

Damit wären die Ergebnisse des radioaktiven Eisencitrattransportes (3.3.2.) erklärbar: Obwohl der Transportversuch mit in EAM suspendierten Zellen durchgeführt wurde, blieben an der Zelloberfläche der in Serum gezüchteten Bakterien Serumproteine haften, da die Zellen nur mit EAM gewaschen worden waren. Diese Proteine beeinträchtigten dann die Aufnahme des radioaktiven Eisens. Diese Vermutung ließe sich überprüfen, indem man vor dem Transportexperiment die Zellen, wie vor der Membrantrennung, mit 0,1 % SDS statt EAM wäscht. Ein besserer Eisentransport würde die obige Annahme bestätigen. Somit wäre auch erklärbar, weshalb die Zellen auch bei Zugabe von viel Citrat (5 mM) nicht in Serum wachsen können.
Griffith und Humphreys (55) geben als Ursache dafür, daß in Muttermilch und Rindercolostrum Citrat nicht in der Lage ist, E.coli mit Eisen zu versorgen, folgende Erklärung: das in Milch vorhandene

Bicarbonat, das für die Bindung von Eisen an Lactoferrin und Transferrin notwendig ist, hebt die Wirkung von Citrat auf.
Da auch in Serum Bicarbonat enthalten ist, wäre auch diese Theorie erwägenswert für die Erklärung, warum E.coli in Serum nicht wächst. Da das Citratsystem jedoch nur von Eisencitrat induziert werden kann, sollte es in Serum nicht induziert werden, wenn Citrat kein Eisen von Transferrin abziehen kann. Eventuell ist es jedoch in der Lage, Eisen von Aerobactin, sofern dies von den Zellen ausgeschieden wird, zu erlangen. Dies wäre vielleicht eine Erklärung dafür, daß in Abb. 10 das FecA-Protein bei den Aerobactin-ausscheidenden Stämmen vorhanden ist, nicht aber bei AB2847. Weitere SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen äußerer Membranen von in Serum gezüchteten und mit SDS gewaschenen E.coli Stämmen, mit und ohne Synthese von Aerobactin, könnten wohl mehr Klarheit darüber verschaffen.
Gegen diesen Effekt von Bicarbonat sprechen jedoch Induktions- und Wachstumsversuche in definiertem Medium mit Eisentransferrin und Bicarbonat (3.3.1. und 3.3.3.1.): Bicarbonat mag vielleicht die Ursache dafür sein, daß in diesem Medium mehr Citrat (500 µM) für gutes Wachstum notwendig ist, doch hebt es die Wirkung von Citrat hier sicher nicht auf.

4.2. Auswirkung des Enterochelin-Eisentransportsystems in Eisentransferrin-haltigem Minimalmedium und Kälberserum

Von vielen Autoren wurde Enterochelin als wachstumsstimulierender und virulenzsteigernder Eisenchelator - sowohl bei E.coli als auch bei Salmo-

nella typhimurium - beschrieben (28,56,89,154, 162). Mit seiner hohen Assoziationskonstante von 10^{52} ist Enterochelin in der Lage, Eisen(III) aus dem Komplex mit Transferrin (Assoz.konst. 10^{36}) zu lösen (32,116). Dies zeigten auch Wachstumskurven von E.coli in synthetischem, transferrinhaltigem (1/3 mit Eisen besetzt) Medium (3.2.1.): wie in M9-Medium ohne Transferrin und Bicarbonat reichen hier 20 µM DHB aus, um das Wachstum von aroB Mutanten zu stimulieren. In Serum kommt das Enterochelin-Eisenaufnahmesystem nicht zum Tragen. Stämme, die selbst Enterochelin ausscheiden, können mit Hilfe des Enterochelinsystems in Kälberserum nicht besser wachsen (s. 3.2.2.1.). Auch wenn im Vergleich zu synthetischem Medium dem Serum die zehnfache Menge der Vorstufe DHB (200 µM) zugegeben wird, bringt dies aroB Stämmen keinen Wachstumsvorteil (3.2.2.2.). Obwohl also Enterochelin eindeutig fähig ist, transferringebundenes Eisen zu erlangen, kann es in Serum Zellen mit intaktem Enterochelin-Transportsystem trotzdem nicht mit Eisen versorgen.

Ursache hierfür sind wohl Antikörper im Serum, die neben Transferrin zu dessen bakteriostatischer Wirkung beitragen. Aus Humanserum wurden enterochelinspezifische Immunglobuline (IgA) isoliert, die spezifisch die Aufnahme von Eisen über Enterochelin hemmen, nicht jedoch über Citrat oder Ferrichrom (107,108). Außerdem wurden Antikörper gegen den Colitose-Rest des Lipopolysaccharids von E.coli O111 in Pferdeserum nachgewiesen (44). Diese LPS-spezifischen Antikörper sollen die Exkretion von Enterochelin hemmen.

Beide Arten von Antikörpern - ob die Ausscheidung oder die Aufnahme von Enterochelin hemmend - sind als Ursache für die blockierte Eisenversorgung in dem hier benutzten Kälberserum vorstellbar, da zu den Kulturen nur die Vorstufe DHB und nicht Enterochelin gegeben wurde.

4.3. Auswirkung des Aerobactin-Eisenaufnahmesystems in Serum

In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse anderer Autoren (22,37,138,147,155,156) bestätigt werden: Der Besitz eines ColV-Plasmids verhilft einem Bakterium zu besserem Wachstum in Serum (3.1.1., 3.1.2., 3.1.6.). Die Wachstumskurven verschiedener Mutanten (iut, aer, fhuB) in Kälberserum zeigen, daß das Aerobactin-Eisenaufnahmesystem dafür verantwortlich ist (3.1.3.). FhuA übt einen polaren Effekt auf fhuCDB aus.

Mit den vorliegenden Ergebnissen nicht erklärbar ist die Tatsache, daß alle Synthesemutanten (aer) doch noch etwas besser wachsen als Transportmutanten (iut) oder Stämme ohne ColV-Plasmid. Es scheint unwahrscheinlich, daß die Stämme noch etwas Aerobactin oder ein noch teilweise aktives Aerobactin ausscheiden, da all die verschiedenen Synthesemutanten fast gleiche Wachstumsraten aufweisen (s. 3.1.3.3.). Theoretisch denkbar wäre vielleicht, daß ein intakter Transportweg andere Faktoren begünstigt, die einem Wachstumsvorteil in Serum bewirken können. Könnte Citrat eine gewisse Rolle spielen ?

Die Ergebnisse von 3.1.3.5. deuten darauf hin, daß auf dem ColV-Plasmid eventuell ein weiterer Faktor lokalisiert ist, der eine gewisse Serumresistenz bewirkt. Es scheint, daß nur bei gemeinsamer Expression des Aerobactin-Genbereiches und dieses Faktors die "volle", vom Complementsystem unabhängige Serumresistenz möglich wird. In den bisher untersuchten ColV-Plasmidbereichen konnte ein solcher Faktor nicht identifiziert werden. Es wäre jedoch sinnvoll, weitere klonierte Bereiche dieses Plasmides darauf zu untersuchen, ob sie nicht, ähnlich wie Synthesemutanten, ein gewisses Wachstum in Kälberserum ermöglichen, bzw. zusammen mit

dem klonierten Aerobactin-Genbereich das Zellwachstum stark stimulieren.
Um der weiteren, vorstellbaren Variante einer notwendigen Kooperation des Rezeptorgenes *iut* mit diesem hypothetischen Faktor nachzugehen, wären eventuell Wachstumsversuche mit folgenden zu konstruierenden Stämmen erwägenswert: E.coli K-12 zum einen mit kloniertem Aerobactin-Genbereich, jedoch ausgeschaltetem Synthesegen (*aer*), zum anderen mit einer Kombination dieses Plasmides mit verschiedenen, außerhalb des Aerobactingenes liegenden Plasmidbereichen, stets im gleichen Stammhintergrund.

Moll und andere beschrieben einen colorimetrischen Schnelltest zur Bestimmung bakterieller Serumresistenz (106). Andere Autoren zeigten jedoch Schwächen dieses Verfahrens auf (115). Bei den in dieser Arbeit benutzten, geringen Zelldichten der Testkulturen scheint die Schnellmethode gänzlich ungeeignet, so daß die aufwendige Lebendkeimzahlbestimmung sicher das genaueste und am besten zu reproduzierende Verfahren darstellt.

In Humanserum sind die Wachstumsunterschiede zwischen Stämmen mit funktionierender Eisenversorgung über Aerobactin und Stämmen ohne diese nicht so stark ausgeprägt wie in Kälberserum (s. 3.1.6.). Die Ergebnisse weisen jedoch die gleiche Tendenz auf: abhängig vom Stammhintergrund bewirkt das Eisenaerobactin-Aufnahmesystem eine mehr oder weniger starke Wachstumsstimulierung in Humanserum. Als Ursache für die geringere Wachstumsstimulierung in Humanserum sind Antikörper denkbar, die bei der Inaktivierung des Complementsystems nicht zerstört werden (30). Diese Antikörper treten wohl mit der Bakterienzelloberfläche in Wechselwirkung und behindern so die Eisenversorgung. Es hat den Anschein, daß in Humanserum

mehr solche spezifische Antikörper enthalten sind als in Kälberserum. Auch scheinen manche E.coli Stämme stärker betroffen zu sein, da besonders in Humanserum der Grad der Wachstumsstimulierung durch Aerobactin vom Stammhintergrund abhängt (3.1.6.).

4.4. Vergleich der untersuchten Eisenaufnahmesysteme in Bezug auf ihre Virulenzsteigerung

In unverdünntem Serum sind E.coli Stämme, die ein Aerobactin-Eisenaufnahmesystem besitzen, eindeutig im Vorteil gegenüber solchen, die sich nur über das Enterochelin- und bzw. oder Citrat-Eisenaufnahmesystem mit Eisen versorgen können. Nur Aerobactin führt zu einer Wachstumsstimulierung in Serum, überwindet also dessen bakteriostatische Wirkung. Eine virulenzsteigernde Wirkung kann folglich nach den Ergebnissen dieser Arbeit allein dem Aerobactin zugeschrieben werden.

Obwohl Enterochelin in der Eisen(III)bindung dem Aerobactin weit überlegen ist (73), ist es in Serum bei der Gewinnung von Transferrineisen doch im Nachteil (91,114). Dies wurde damit erklärt, daß Enterochelin als aromatisches, hydrophobes Molekül sich leichter an Proteine anlagert und als Hapten bei der Synthese von Antikörpern wirkt und daß Serumalbumin an Enterochelin bindet (91). Im Gegensatz zu Enterochelin (107,108) wurden gegen Aerobactin noch keine Antikörper, die in normalem Humanserum vorkommen, nachgewiesen. Ein weiterer Vorteil von Aerobactin ist, daß es beim Transport von Eisen in die Bakterienzelle nicht modifiziert wird (19). Es kann also wieder verwendet werden

und muß nicht wie Enterochelin neu synthetisiert werden, was für die Bakterienzelle einen erheblichen Aufwand darstellt.

Besonders ökonomisch für Bakterienzellen ist es, einen Eisenchelator, der in der Umgebung vorhanden ist und nicht erst synthetisiert werden muß, zu ihrer Eisenversorgung zu nutzen. Hier würde sich das in Serum natürlich vorkommende Citrat geradezu anbieten. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen jedoch, daß das citratabhängige Eisentransportsystem in Serum wohl keine Rolle spielt, da auch dieser im Vergleich zu Enterochelin deutlich schwächere Eisenkomplexbildner nicht in der Lage ist, die bakteriostatische Wirkung des Serums - hauptsächlich bewirkt durch Transferrin und Antikörper - zu überwinden (s. 4.1.).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Anhand von Wachstumsversuchen konnte - in unverdünntem Kälberserum deutlicher als in Humanserum - gezeigt werden, daß der Besitz eines ColV-Plasmids E.coli in die lager versetzt, sich in Serum mit dem für gutes Zellwachstum erforderlichen Eisen zu versorgen. Dafür ist das Aerobactin-Eisenaufnahmesystem verantwortlich, wie am Wachstum verschiedener Mutanten (Transport- und Synthesemutanten) nachgewiesen wurde. Dabei konnte auch bestätigt werden, daß fhuA einen polaren Effekt auf fhuBCD ausübt.

Dem Aerobactin konnte im Gegensatz zu Enterochelin und Citrat eindeutig eine wachstumssteigernde Wirkung zugeschrieben werden. Trotz schneller Vermehrungsrate, in 25 Std. von 10^3 auf 10^9 Zellen pro ml, ist die Eisenversorgung begrenzt, wie an der Induktion der ß-Galactosidase in Stämmen gezeigt wurde, in denen das lacZ Gen unter Eisenkontrolle exprimiert wird (Operonfusionen).

Weder Enterochelin noch Citrat waren in Kälberserum in der Lage, den Bakterienzellen genug Eisen zuzuführen. In synthetischem Medium mit zu 1/3 mit Eisen besetztem Transferrin und mit Bicarbonat gelang es jedoch beiden Chelatoren, Eisen aus Transferrin zu lösen und den Bakterienzellen zu besserem Wachstums zu verhelfen. Obwohl das Eisen-Dicitrattransportsystem in Serum induziert wird, erfolgt in vitro kaum Eisentransport. Dies führt zu der Annahme, daß das Eisentransportsystem durch im Serum vorhandene Proteine (Antikörper) beeinträchtigt wird.

7. LITERATUR

1. Aasa, R., Malström, B.G., Saltmann, P., Vänngård, T. (1963) Biochim. Biophys. Acta 75, 203-222

2. Aguero, M.E., Cabello, F.C. (1983) Infect. Immun. 40, 359-368

3. Aisen, P. (1980) in: "Iron in Biochemistry and Medicine, II"(Jacobs, A., Worwood, M., eds.), Academic Press, London, New York, pp.87-129

4. Aisen, P., Leibman, A. (1968) Biochem. Biophys. Res. Comm. 32, 220-226

5. Aisen, P., Leibman, A. (1972) Biochim. Biophys. Acta 257, 314-323

6. Archibald, F. (1983) FEMS Microbiol.Lett. 19, 29-32

7. Bachmann, B.J. (1983) Microbiol. Rev. 47, 180-230

8. Bassford, P.J., Schnaitman, C.A., Kadner, R.J. (1977) J. Bacteriol. 130, 750-758

9. Bates, G.W., Schlabach, M.R. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3228-3232

10. Bernàt, I. (1983) "Iron Metabolism", Plenum Press, New York

11. Bindereif, A., Braun, V., Hantke, K. (1982) J. Bacteriol. 150, 1472-1475

12. Bindereif, A., Neilands, J.B. (1983) J. Bacteriol. 153, 1111-1113

12'. Bindereif, A., Neilands, J.B. (1985) J. Bacteriol. 161, 727-735

13. Binns, M.M., Davies, D.L., Hardy, K.G. (1979) Nature 279, 778-781

14. Binns, M.M., Mayden, J., Levine, R.P. (1982) Infect. Immun. 35, 654-659

15. Braun, V. (1981) FEMS Microbiol. Lett. 11, 225-228

16. Braun, V. (1981) Forum Mikrobiologie 2, 69-72

17. Braun, V. (1983) in: "Microbiology 1983" (Schlessinger, D., ed.) , Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., pp.301-305

18. Braun, V. (1983) The Iron Transport Systems of Escherichia coli, in "The Enzymes of Biological Membranes" (Martonisi, A.N., ed.), Plenum Press, New York

19. Braun, V., Brazel-Faisst, C., Schneider, R. (1984) FEMS Microbiol. Lett. 21, 99-103

20. Braun, V., Burkhardt, R. (1982) J. Bacteriol. 152, 223-231

21. Braun, V., Burkhardt, R., Schneider, R., Zimmermann, L. (1982) J. Bacteriol. 151, 553-559

22. Braun, V., Gross, R., Köster, W., Zimmermann, L. (1983) Molec. Gen. Genet. 192, 131-139

23. Braun, V., Günthner, K., Hantke, K., Zimmermann, L. (1983) J. Bacteriol. 156, 308-315

24. Braun, V., Hancock, R.E.W., Hantke, K., Hartmann, A. (1976) J. Supramol. Struct. 5, 37-58

25. Braun, V.,Hantke, K. (1981) Bacterial cell surface receptors in "Organization of procaryotic cell membranes" (Ghosh, B.K., ed.), Vol.II, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.1-74

26. Braun, V., Hantke, K. (1982) Receptor-dependent transport systems in Escherichia coli for iron complexes and vitamin B12, in "Membranes and Transport", Vol.II, Plenum Press, London, New York, pp.107-113

27. Braun, V.,Schaller, K., Wolff, H. (1973) Biochim. Biophys. Acta 328, 87-97

28. Brock, J.H., Pickering, M.G., McDowall, M.C., Deacon, A.G. (1983) Infect. Immun. 40, 453-459

29. Bullen, J.J. (1983) in "Microbiology 1983" (Schlessinger, D., ed.), Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., pp.327-328

30. Bullen, J.J., Rogers, H.J., Griffith, E. (1974) in: "Microbial Iron Metabolism" (Neilands, J.B., ed.), Academic Press, New York, London, pp.517-551

31. Bullen, J.J., Rogers, H.J., Griffith, E. (1978) Curr. Topics in Microbiol. and Immun. 80, 1-35

32. Carrano, C.J., Raymond, K.N. (1979) J. Am. Chem. Soc. 101, 5401-5404

33. Casadaban, M.J., Cohen, S.N. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4530-4533

34. Cooper, S.R., McArdle, J. Raymond, K.N. (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3551-3554

35. Coulton, J., Mason, P.,Du Bow, M. (1983) J. Bacteriol. 156, 1315-1321

36. Cox, G.B., Gibson, F., Luke, R.K.J., Newton, N.A., O'Brien, I.G., Rosenberg, H. (1970) J. Bacteriol. 104, 219-226

37. Davies, D.L., Falkiner, F.R., Hardy, K.G. (1981) Infect. Immun. 31, 574-579

38. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S. "Microbiology" 3rd ed., Harper Internation Edition

39. Delaney, T.A., Morgan, W.H., Morgan, E.H. (1982) Bichim. Biophys. Acta 701, 295-304

40. Eaton, J.W., Brandt, P., Mahoney, J.R. (1982) Science 215, 691-693

41. Emery, T. (1980) Nature 287, 776

42. Ernst, J.F., Bennet, R.L., Rothfield, L.I. (1978) J. Bacteriol. 135, 928-934

43. Fecker, L.,Braun, V. (1983) J. Bacteriol. 156, 1301-1314

44. Fitzgerald, S.P., Rogers, H.J. (1980) Infect. Immun. 27, 302-308

45. Fries, J., Getrost, H. (1975) "Organische Reagenzien für die Spurenanalyse" Merck, E., Darmstadt, pp.129-130

46. Frost, G.E., Rosenberg, H. (1973) Biochim. Biophys. Acta 330, 90-101

47. Frost, G.E., Rosenberg, H. (1975) J. Bacteriol. 124, 704-712

48. Funakoshi, S., Doi, T., Nakajima, T., Suyama, T., Tokuda, M. (1982) Microbiol. Immunol. 26, 227-239

49. Garibaldi, J.A. (1972) J. Bacteriol. 110, 262-265

50. Gibson, F., Magrath, D.J. (1969) Biochim. Biophys. Acta 192, 175-184

51. Goebel, W., Hedgpeth, J. (1982) J. Bacteriol. 151, 1290-1298

52. Greenwood, K.T., Luke, R.K.J. (1978) Biochim. Biophys. Acta 525, 209-218

53. Grewal, K.K., Warner, P.J., Williams, P.H. (1982) FEBS Lett. 140, 27-30

54. Griffith, E. (1983) in: "Microbiology 1983" (Schlessinger, D., ed.) Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., pp.329-333

55. Griffith, E., Humphreys, J. (1977) Infect. Immun. 15, 396-401

56. Griffith, E., Humphreys, J. (1980) Infect. Immun. 28, 286-289

57. Gross, R., Engelbrecht, F., Braun, V. (1984) Molec. Gen. Genet. 196, 74-80

58. Guterman, S.K. (1971) Bichem. Biophys. Res. Comm. 44, 1149-1155

59. Guterman, S.K. (1973) J. Bacteriol. 114, 1217-1224

60. Hall, B.G. (1982) J. Bacteriol. 151, 269-273

61. Hancock, R.E.W., Braun, V. (1976) J. Bacteriol. 125, 409-415

62. Hancock, R.E.W., Hantke, K., Braun, V. (1976) J. Bacteriol. 127, 1370-1375

63. Hancock, R.E.W., Hantke, K., Braun, V. (1977) Arch. Microbiol. 114, 231-239

64. Hantke, K. (1981) Molec. Gen. Genet. 182, 288-292

65. Hantke, K. (1982) FEMS Microbiol. Lett. 15, 83-86

66. Hantke, K. (1983) Molec. Gen. Genet. 191, 301-306

67. Hantke, K. (1984) Molec. Gen. Genet. 197, 337-341

68. Hantke, K., Braun, V. (1975) FEBS Lett. 49, 301-305

69. Hantke, K., Braun, V. (1975) FEBS Lett. 59, 272-281

70. Hantke, K., Braun, V. (1978) J. Bacteriol. 135, 190-197

71. Hantke, K., Zimmermann, L. (1981) FEMS Microbiol. Lett. 12, 31-35

72. Harmon, R.J., Schanbacher, F.L., Ferguson, L.C., Smith, K.L. (1976) Infect. Immun. 13, 533-542

73. Harris, W.R., Carrano, C.J., Raymond, K.N. (1979) J. Am. Chem. Soc. 101, 2722-2727

74. Hartmann, A., Braun, V. (1980) J. Bacteriol. 143, 246-255

75. Hartmann, A., Braun, V. (1981) Arch. Microbiol. 130, 353-356

76. Hartmann, A., Fiedler, H.-P., Braun, V. (1979) Eur. J. Biochem. 99, 517-524

77. Heidinger, S., Braun, V., Pecoraro, V.L., Raymond, K.N. (1983) J. Bacteriol. 153, 109-115

78. Hollifield, W.C., Neilands, J.B. (1978) Biochemistry 17, 1922-1928

79. Huebers, H., Csiba, E.; Josephson, B., Huebers, E., Finch, C. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 621-625

80. Hussein, S., Hantke, K., Braun, V. (1981) Eur. J. Biochem. 117, 431-437

81. Ichihara, S., Mizushima, S. (1978) J. Biochem. 83, 137-140

82. Kadner, R.J., Heller, K., Coulton, J.W., Braun, V. (1980) J. Bacteriol. 143, 256-264

83. Kadner, R.J., McElhaney, G. (1978), J. Bacteriol. 134, 1020-1029

84. Klebba, P.E., McIntosh, M.A., Neilands, J.B. (1982) J. Bacteriol. 149, 880-888

85. Kluger, M.J., Rothenburg, B.A. (1979) Science 203, 374-376

86. Kluger, M.J., Tocco, R.J., Ucar, D.D. (1983) in: "Microbiology 1983" (Schlessinger, D., ed.), Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., pp.338-341

87. Kochan, I. (1969) J. Infect. Dis. 119, 11-18

88. Kochan, I. (1983) in: " Microbiology 1983" (Schlessinger, D., ed.), Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., pp.342-345

89. Kochan., I., Kvach, J.T., Wiles, T.I. (1977) J. Infect. Dis. 135, pp.623-632

90. Konisky, J., Soucek, S., Frick, K., Davies, J.K., Hammond, C. (1976) J. Bacteriol. 127, 249-257

91. Konopka, K., Neilands, J.B. (1984) Biochemistry 23, 2122-2127

92. Krone, W.J.A., Luirink, J., Koningstein, G., Oudega, B., de Graaf, F.K. (1983) J. Bacteriol. 156, 945-948

93. Krone, W.J.A., Oudega, B., Stegehuis, F., de Graaf, F.K. (1983) J. Bacteriol. 153, 716-721

94. Langman, L., Young, I.G., Frost, G.E., Rosenberg, H., Gibson, F. (1972) J. Bacteriol. 112, 1142-1149

95. Leong, J. Neilands, J.B. (1976) J. Bacteriol. 126, 823-830

96. Light, A., Clegg, R. (1974) in: "Microbial Iron Metabolism" (Neilands, J.B., ed.) Academic Press, New York, London

97. Luckey, M., Pollak, J.R., Wayne, R., Ames, B.N., Neilands, J.B. (1972) J. Bacteriol. 111, 731-738

98. Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., van der Hoek, P.,van Alphen, L. (1975) FEBS Lett. 58, 254-258

99. Marcelis, J.H. (1980) Vet. Res. Comm. 4, 151-164

100. McDougall, S., Neilands, J.B. (1984) J. Bacteriol. 159, 300-305

101. McIntosh, M. (1983) in: "Microbiology 1983" (Schlessinger, D., ed.), Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., pp.296-300

102. McIntosh, M., Chenault, S.S., Earhart, C.F. (1979) J. Bacteriol. 137, 653-657

103. McIntosh, M., Earhart, C.F. (1977) J. Bacteriol. 131, 331-339

104. McNabb, P.C., Tomasi, T.B. (1981) Ann. Rev. Microbiol. 35, 447-496

105. Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

106. Moll, A., Cabello, F., Timmis, K. (1979) FEMS Microbiol. Lett. 6, 273-276

107. Moore, D.G., Earhart, C.F. (1981) Infect. Immun. 31, 631-635

108. Moore, D.G., Yancey, J., Lankford, C.E., Earhart, C.F. (1980) Infect. Immun. 27, 418-423

109. Morgan, E.H. (1980) in: "Iron in Biochemistry and Medicine, II (Jacobs, A., Worwood, M., eds.), Academic Press, London, New York, pp.641-687

110. Murray, G.J., Clark, G.E.D., Parniak, M.A., Viswanatha, T. (1977) Can. J. Biochem. 55, 625-629

111. Neilands, J.B. (1974) in "Microbial Iron Metabolism" (Neilands, J.B., ed.), Academic Press, New York, London

112. Neilands, J.B. (1981) Ann. Rev. Biochem. 50, 715-731

113. Neilands, J.B. (1982) Ann. Rev. Microbiol. 36, 285-309

114. Neilands, J.B. (1983) in: "Microbiology 1983" (Schlessinger, D., ed.), Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., pp.284-287

115. Nilius, A.M., Savage, D.C. (1984) FEMS Microbiol. Lett. 22, 11-14

116. O'Brien, I.G., Cox, G.B., Gibson, F. (1971) Biochim. Biophys. Acta 237, 537-549

117. Parniak, M.A., Jackson, G.E.D., Murray, G.J., Viswanatha, T. (1979) Biochim. Biophys. Acta 569, 99-108

118. Payne, S.M. (1980) J. Bacteriol. 143, 1420-1424

119. Perry, R.D., San Clemente, C.L. (1979) J. Bacteriol. 140, 1129-1132

120. Pierce, J.R., Pickett, C.L., Earhart, C.F. (1983) J. Bacteriol. 155, 330-336

121. Pollack, J.R., Neilands, J.B. (1970) Biochem. Biophys. Res. Comm. 38, 989-992

122. Prodý, C.A., Neilands, J.B. (1984) J. Bacteriol. 157, 874-880

123. Pugsley, A.P., Reeves, P. (1976) J. Bacteriol. 126, 1052-1062

124. Pugsley, A.P., Reeves, P. (1976) J. Bacteriol. 127, 218-228

125. Pugsley, A.P., Reeves, P. (1976) Biochem. Biophys. Res. Comm. 70, 846-853

126. Raymond, K.N., Carrano, C.J. (1979) Acc. Chem. Res. 12, 183-190

127. Reynolds, P.R., Mottur, G.P., Bradbeer, C. (1980), J. Biol. Chemistry 255, 4313-4319

128. Roeser, H.P. (1980) in: "Iron in Biochemistry and Medicine, II" (Jacobs, A., Worwood, M., eds.) Academic Press, London, New York, pp.605-640

129. Rogers, H.J. (1973) Infect. Immun. 7, 445-456

130. Rogers, H.J. (1974) in:"Microbiology" (Schlessinger, D., ed.) Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., pp.289-298

131. Rogers, S., Warren, R.A., Neilands, J.B. (1963) Nature 200, 167

132. Rosenberg, H., Young, I.G. (1974) in: "Microbial Iron Metabolism" (Neilands, J.B., ed.) Academic Press, New York, London, pp.67-82

133. Sawatzki, G. (1982) persönl. Mitteilung

134. Sawatzki, G., Hoffmann, F.A., Kubanek, B. (1983) Infect. Immun. 39, 659-665

135. Schneider, R., Hartmann, A., Braun, V. (1981) FEMS Microbiol. Lett. 11, 115-119

136. Simonson, C. Trivett, T., DeVoe, I.W. (1981) Infect. Immun. 31, 547-553

137. Stanier, R.Y., Adelberg, E.A., Ingraham, J.L. (1977) "General Microbiology", Macmillan Press LTD., London, Basingstoke, pp.785-809

138. Stuart, S.J., Greenwood, K.T., Luke, R.K.J. (1980), J. Bacteriol. 143, 35-42

139. Udenfried, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W., Weigele, M. (1972) Science 178, 871-872

140. Taylor, P.W. (1983) Microbiological Reviews 47, 46-83

141. Valenti, P., De Stasio, A., Mastromerino, P., Seganti, L., Sinibaldi, L., Orsi, N. (1981) FEMS Microbiol. Lett. 10, 77-79

142. Van Snick, J.L., Masson, P.L., Heremans, J.F. (1974) J. Exp. Med. 140, 1068-1084

143. Van Tiel-Menkveld, G.J., Oudega, B., Kempers, O., De Graaf, F.K. (1981) FEMS Microbiol. Lett. 12, 373-380

144. Van Tiel-Menkveld, G.J., Mentjox-Vervuurt, J.M., Oudega, B., De Graaf, F.K. (1982) J. Bacteriol. 150, 490-497

145. Wagegg, W. (1980) Dissertation, Universität Tübingen

146. Wagegg, W., Braun, V. (1981) J. Bacteriol. 145, 156-163

147. Warner, P.J., Williams, P.H., Bindereif, A., Neilands, J.B. (1981) Infect. Immun. 33, 540-545

148. Wayne, R., Neilands, J.B. (1975) J. Bacteriol. 121, 497-503

149. Weaver, C.A., Konisky, J. (1980) J. Bacteriol. 143, 1513-1518

150. Weinberg, E.D. (1966) Bacteriol. Rev. 30, 136-151

151. Weinberg, E.D. (1974) Science 184, 952-956

152. Weinberg, E.D. (1978) Microbiol. Rev. 42, 45-66

153. Werner, R.G., Erne, A.M., Stecher, A., Goeth, H. (1983) FEMS Microbiol. Lett. 17, 131-136

154. Wilkins, T.D., Lankford, C.E. (1970) J. Inf. Dis. 121, 129-136

155. Williams, P.H. (1979) Infect. Immun. 26, 925-932

156. Williams, P.H., Warner, P.J. (1980) Infect. Immun. 29, 411-416

157. Woodrow, G.C., Langman, L., Young, I.G., Gibson, F. (1978) J. Bacteriol. 133, 1524-1526

158. Wookey, P. (1982) FEBS Lett. 139, 145-154

159. Wookey, P., Hussein, S., Braun, V. (1981) J. Bacteriol. 146, 1158-1161

160. Wookey, P., Rosenberg, H. (1978) J. Bacteriol. 133, 661-666

161. Worsham, P.L., Konisky, J. (1981) J. Bacteriol. 145, 647-650

162. Yancéy, R.J., Breeding, S.A.L., Lankford, C.E. (1979) Infect. Immun. 24, 174-180

163. Zimmermann, L. (1983) Dissertation, Universität Tübingen

164. Zimmermann, L., Hantke, K., Braun, V. (1984) J. Bacteriol. 159, 271-277

LEBENSLAUF

Cornelia Brazel-Faisst, geb. Brazel

21. Juni 1954	geboren in Schwäbisch Gmünd
1961 - 1965	Grundschule in Schwäbisch Gmünd
1965 - 1973	Hans-Baldung-Gymnasium in Schwäbisch Gmünd
05. Juni 1973	Abitur
Sept. 1973 bis März 1974	Sprachausbildung in Nizza und Lausanne
ab SS 1974	Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
07. April 1976	Diplomvorprüfung
WS 1978/79	Mündliche Diplomhauptprüfung mit Hauptfach Mikrobiologie
SS 1979 bis WS 1980/81	Anfertigung der Diplomarbeit "Exoenzyme aus Serratia marcescens DSM 30122"
01.07.1983	Hochzeit mit Thomas Faisst
ab Januar 1981	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II, der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Volkmar Braun

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Altendorf, D. Ammermann, R.E. Bader, F.W. Bentrup, W.U. Berthold, W. Bessler, E. Betz, V. Braun, D. Bunke, K. Dobat, U. Feine, H.K. Gaukler, K.G. Grell, J. Guglielmi, W.F. Haberlandt, K.-P. Hadeler, K. Hantke, R. Jacob, G. Jung, E. Kallee, G. Kissling, E. Kulzer, W. Loeffler, D. Malchow, D. Mecke, H. Meier, G.F. Meyer, W. Nakel, F. Oberwinkler, C. Pelling, K. Poralla, W. Rähle, A. Rieker, H. Ritter, B. Röttger, H.U. Schairer, J. Schmitt, B. Schwemmle, H. Seiler, W. Seyffert, J. Strähle, H. Tichy, G. Winkelmann, H. Zähner, K. Zielke.